

**DISEÑO INTEGRAL DE BIORREACTORES CONTINUOS
DE TANQUE AGITADO APLICADOS A
PROCESOS DE FERMENTACIÓN**

ISABEL CRISTINA PAZ ASTUDILLO

Ingeniera Química, M.Sc.



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA SEDE MANIZALES
FACULTAD DE INGENIERÍA
DOCTORADO EN INGENIERÍA AUTOMÁTICA
MANIZALES**

2010

**DISEÑO INTEGRAL DE BIORREACTORES CONTINUOS
DE TANQUE AGITADO APLICADOS A
PROCESOS DE FERMENTACIÓN**

ISABEL CRISTINA PAZ ASTUDILLO

Ingeniera Química, M.Sc.

**Tesis para optar al título de
Doctora en Ingeniería Automática**

Director

CARLOS ARIEL CARDONA

Ingeniero Químico, M.Sc., Ph.D.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA SEDE MANIZALES

FACULTAD DE INGENIERÍA

DOCTORADO EN INGENIERÍA AUTOMÁTICA

MANIZALES

2010

*Gracias Dios:
por cada cosa que me has dado,
por cada cosa que has negado,...
por morir por mí en una Cruz.*

*A mi esposo Juan Bernardo y a mi hijo Juan Diego
por ceder gran parte de su tiempo a este trabajo.*

AGRADECIMIENTOS

La autora expresa sus agradecimientos a:

El Profesor Carlos Ariel Cardona, Director de la Investigación, por su comprensión, confianza y motivación durante el desarrollo del trabajo.

La Doctora Aída Rodríguez de Stouvenel, El Doctor Gerard Olivar Tost, y el Doctor Yuri Pisarenko, miembros del Comité Evaluador de este trabajo, por sus amables apreciaciones.

El Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación - COLCIENCIAS, por financiar mi trabajo a través de la Convocatoria de Doctorados Nacionales – 2006.

La Universidad Nacional de Colombia, por el apoyo económico al proyecto “Diseño integral de biorreactores continuos de tanque agitado aplicados a procesos de fermentación” a través de la Convocatoria Nacional de Investigación 2009, modalidad 5.

El Profesor Alberto Bandoni, Director del Grupo de Ingeniería de Procesos y Sistemas de la Planta Piloto de Ingeniería Química (Universidad Nacional del Sur - CONICET) de la ciudad de Bahía Blanca en Argentina, por acogerme en su grupo de trabajo y facilitar herramientas e información para el desarrollo de este trabajo.

El Doctor Aníbal Blanco, Investigador del Grupo de Ingeniería de Procesos y Sistemas de la Planta Piloto de Ingeniería Química (Universidad Nacional del Sur - CONICET) de la

ciudad de Bahía Blanca en Argentina, por su amable direccionamiento en el trabajo realizado.

El Profesor Víctor Haber Pérez, Director del Grupo de Investigación en Biomagnetismo aplicado en Ingeniería de Procesos de la Universidad Estatal del Norte Fluminense de la Ciudad de Campos dos Goitacazes en Brasil, por su amable acogida en su grupo de trabajo, y por aportar conocimientos para mi desarrollo profesional.

La Profesora Gloria Inés Giraldo, por su amable e incansable colaboración en la realización de las pruebas de análisis en el cromatógrafo.

Los Ingenieros Químicos Julián Andrés Quintero y Mauricio Naranjo por su colaboración en el desarrollo de ideas y realización del trabajo experimental.

La Estudiante de Ingeniería Química Mayra Ramírez por su colaboración en la realización de pruebas experimentales.

La Enfermera Jefe Carmen Rosa Astudillo y al Administrador Público Alejandro Astudillo por confiar en mí, y ser mis codeudores ante el ICETEX en el crédito condonable concedido por COLCIENCIAS.

CONTENIDO

	pág.
AGRADECIMIENTOS	iv
LISTA DE TABLAS	xii
LISTA DE FIGURAS	xiv
RESUMEN	xvii
ABSTRACT	xix
 INTRODUCCIÓN	 1
 CAPÍTULO 1.	
ESTABILIDAD DE BIORREACTORES CONTINUOS DE TANQUE	
AGITADO PARA PRODUCCIÓN DE ETANOL: REVISIÓN	
BIBLIOGRÁFICA	8
1.1 ESTABILIDAD DE SISTEMAS CONTINUOS	10
1.2 ESTABILIDAD DE SISTEMAS CONTINUOS PARA PRODUCCIÓN DE	
ETANOL	13
1.3 COMPORTAMIENTO OSCILATORIO	15
1.4 EFECTO DE LOS PARÁMETROS DE OPERACIÓN SOBRE LA	
OCURRENCIA DE OSCILACIONES	16
1.4.1 Regulación de las Oscilaciones	18
1.5 DISCUSIÓN	20
REFERENCIAS	22

Tabla de Contenido (Continuación)

CAPÍTULO 2.

CONCEPTOS Y MÉTODOS	29
2.1 MODELAMIENTO DE SISTEMAS BIOQUÍMICOS	29
2.1.1 Modelos No Estructurados	30
2.1.2 Modelos Estructurados	31
2.1.3 Modelos Segregados	33
2.2 ANÁLISIS DE LA DINÁMICA DE SISTEMAS BIOQUÍMICOS	33
2.2.1 Estados Estacionarios	34
2.2.2 Bifurcaciones	36
2.2.3 Caos	37
2.3 MÉTODOS Y HERRAMIENTAS	39
2.3.1 Método Desarrollado para Determinar los Estados Estacionarios del Sistema y Construir Diagramas de Bifurcación	39
2.3.2 Simulación con <i>Aspen Custom Modeler</i>	42
2.3.3 Otras Herramientas Utilizadas	42
REFERENCIAS	44

CAPÍTULO 3.

ESTUDIO DE ESTABILIDAD	49
3.1 CASO DE ESTUDIO I. PRODUCCIÓN DE ETANOL CON <i>ZYMOMONAS</i> <i>MOBILIS</i>	50
3.1.1 Modelo Matemático	50
3.1.2 Efecto de la Velocidad de Dilución	52
3.1.3 Efecto de la Concentración de Sustrato en la Alimentación	56

Tabla de Contenido (Continuación)

	pág.
3.1.4 Respuesta Dinámica del Sistema	60
3.1.5 Evaluación de la Respuesta del Sistema ante Cambios en los Parámetros Durante la Operación Utilizando <i>Aspen Custom Modeler</i>	62
3.2 CASO DE ESTUDIO II. PRODUCCIÓN DE ETANOL CON <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	67
3.2.1 Modelo Matemático	67
3.2.2 Efecto de la Velocidad de Dilución	69
3.2.3 Efecto de la Concentración de Sustrato en la Alimentación	73
3.2.4 Respuesta Dinámica del Sistema	77
3.3 SISTEMA ANAERÓBICO CON AGITACIÓN	80
3.3.1 Modelo Matemático	80
3.3.2 Efecto de los Parámetros de Operación	83
3.3.2.1 Velocidad de Flujo Volumétrica de la Corriente de Gas	83
3.3.2.2 Velocidad de Agitación	86
3.3.2.3 pH del Medio de Cultivo	88
3.3.2.4 Temperatura de Operación	90
3.4 CONCLUSIONES	92
REFERENCIAS	94

CAPÍTULO 4.

ESTUDIO EXPERIMENTAL DEL EFECTO DE LA VELOCIDAD DE AGITACIÓN SOBRE VARIABLES DE INTERÉS EN LA FERMENTACIÓN CON <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	96
4.1 MATERIALES Y MÉTODOS	96

Tabla de Contenido (Continuación)

	pág.
4.1.1 Microorganismo	96
4.1.2 Medio de Cultivo	97
4.1.3 Sistema	97
4.2 RESULTADOS	98
4.3 ANÁLISIS DE RESULTADOS	101
4.4 CONCLUSIONES	103
REFERENCIAS	104
 CAPÍTULO 5.	
EVALUACIÓN EXPERIMENTAL DE LA FERMENTACIÓN DE SACAROSA SIN HIDROLIZAR	105
5.1 MATERIALES Y MÉTODOS	106
5.1.1 Microorganismo	106
5.1.2 Medio de Cultivo	107
5.1.3 Sistema	107
5.1.4 Métodos Analíticos	107
5.2 RESULTADOS	108
5.3 ANÁLISIS DE RESULTADOS	111
5.4. CONCLUSIONES	112
REFERENCIAS	113

Tabla de Contenido (Continuación)

pág.

CAPÍTULO 6.

ESTRATEGIA INTEGRAL DE DISEÑO DE BIORREACTORES CONTINUOS	114
6.1 MÉTODO CONVENCIONAL DE DISEÑO DE BIORREACTORES CONTINUOS DE TANQUE AGITADO	115
6.1.1 Diseño de un Biorreactor para Producción de Etanol con el Método Convencional	117
6.2 MÉTODO MODIFICADO DE DISEÑO DE BIORREACTORES CONTINUOS DE TANQUE AGITADO	120
6.2.1 Diseño de un Biorreactor para Producción de Etanol con el Método Modificado	120
6.3 DISEÑO POR EL MÉTODO TRADICIONAL Vs. DISEÑO POR EL MÉTODO MODIFICADO	121
6.4 ESTRATEGIA INTEGRAL DE DISEÑO DE BIORREACTORES	125
6.5 CONCLUSIONES	127
REFERENCIAS	127

CAPÍTULO 7.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	129
7.1 CONCLUSIONES	129
7.2 OBSERVACIONES Y RECOMENDACIONES	133

Tabla de Contenido (Continuación)

pág.

CAPÍTULO 8.

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA DERIVADA DE LA TESIS	136
8.1 SOFTWARE REGISTRADO	136
8.2 TRABAJOS PUBLICADOS	136
8.2.1 Capítulos en Libros	136
8.2.2 Artículos en Revistas	137
8.2.3 Trabajos en Eventos	137
8.3 TRABAJOS EN REVISIÓN POR CONSEJO EDITORIAL	138
8.4 TRABAJOS EN REMISIÓN	138
8.5 TRABAJOS EN REVISIÓN POR EL TUTOR	139

LISTA DE TABLAS

Tabla	Pág.
1. Propiedades y condiciones de operación reportados para cultivos de <i>S. cerevisiae</i> y <i>Z. mobilis</i>	9
2. Parámetros de operación que afectan los sistemas bioquímicos.	11
3. Influencia de parámetros de operación en la aparición de oscilaciones en sistemas productores de etanol.	19
4. Clasificación de estados estacionarios para un sistema bidimensional.	35
5. Bifurcaciones de estado estacionario elementales para sistemas de codimensión-1.	38
6. Constantes para el modelo de fermentación con <i>Zymomonas mobilis</i>	52
7. Indicativos de producción obtenidos a ciertas condiciones de operación establecidas para el sistema de fermentación con <i>Zymomonas mobilis</i>	59
8. Condiciones de operación establecidas para la producción de etanol por fermentación con <i>Zymomonas mobilis</i>	62
9. Constantes para el modelo de fermentación con <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	69
10. Distribución de las regiones de estabilidad determinadas para el sistema de fermentación con <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	73
11. Indicativos de producción obtenidos a ciertas condiciones de operación establecidas para el sistema de fermentación con <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	76
12. Condiciones de operación establecidas para la producción de etanol por fermentación con <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	80

Lista de Tablas (Continuación)

Tabla	pág.
13. Constantes para el modelo de transferencia de masa.	84
14. Condiciones de operación establecidas para el sistema de fermentación anaeróbica con agitación.	90
15. Resultados de proceso de hidrólisis-fermentación a diferentes pH.	111
16. Constantes del modelo cinético para el diseño por el método convencional.	118
17. Condiciones del proceso de fermentación con <i>Saccharomyces cerevisiae</i> diseñado con el método convencional.	119
18. Condiciones del proceso de fermentación con <i>Saccharomyces cerevisiae</i> diseñado con el método modificado.	122
19. Parámetros y variables de operación que caracterizan los diseños del proceso de fermentación.	123

LISTA DE FIGURAS

Figura	Pág.
1. Diagrama de bifurcación para sistema de producción de etanol con <i>Zymomonas mobilis</i> . $C_{Sf} = 80$ g/L.	53
2. Diagrama de bifurcación para sistema de producción de etanol con <i>Zymomonas mobilis</i> . $C_{Sf} = 160$ g/L.	54
3. Diagrama de bifurcación para sistema de producción de etanol con <i>Zymomonas mobilis</i> . $D = 0.1$ h ⁻¹	57
4. Diagrama de bifurcación para sistema de producción de etanol con <i>Zymomonas mobilis</i> . $D = 0.25$ h ⁻¹	58
5. Respuesta dinámica del sistema de fermentación con <i>Zymomonas mobilis</i> operado a $C_{Sf} = 160$ g/L y $D = 0.15$ h ⁻¹ , para diferentes condiciones iniciales de operación.	61
6 Comportamiento del proceso de fermentación con <i>Zymomonas mobilis</i> ante Variaciones del flujo volumétrico de alimentación durante el arranque del biorreactor.	64
7. Comportamiento del proceso de fermentación con <i>Zymomonas mobilis</i> ante variaciones del flujo volumétrico de alimentación después de alcanzar el estado estable.	65
8. Comportamiento del proceso de fermentación con <i>Zymomonas mobilis</i> ante variaciones en la concentración de sustrato en la alimentación.	66
9. Diagrama de bifurcación para sistema de producción de etanol con <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . $C_{Sf} = 100$ g/L.	70

Lista de Figuras (Continuación)

Figura	pág.
10. Diagrama de bifurcación para sistema de producción de etanol con <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . $C_{sf} = 120$ g/L.	71
11. Diagrama de bifurcación para sistema de producción de etanol con <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . $D = 0.17$ h ⁻¹	74
12. Diagrama de bifurcación para sistema de producción de etanol con <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . $D = 0.25$ h ⁻¹	75
13. Diagrama de fase para el sistema de fermentación con <i>Saccharomyces cerevisiae</i> operado a $C_{sf} = 100$ g/L y $D = 0.2$ h ⁻¹	78
14. Respuesta dinámica del sistema de fermentación con <i>Saccharomyces cerevisiae</i> operado a $C_{sf} = 100$ g/L y $D = 0.2$ h ⁻¹	79
15. Diagrama de bifurcación para el sistema anaeróbico con agitación en la fermentación con <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . $N_a = 200$ rpm, pH = 4, T = 32 °C.	85
16. Diagrama de bifurcación para el sistema anaeróbico con agitación en la fermentación con <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . $F_g = 400$ L/h, pH = 4, T = 32 °C.	87
17. Consumo de potencia en función de la velocidad de agitación para la fermentación anaeróbica con <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . $F_g = 400$ L/h, pH = 4, T = 32 °C.	88
18. Diagrama de bifurcación para el sistema anaeróbico con agitación en la fermentación con <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . $F_g = 400$ L/h, $N_a = 150$ rpm, T = 32 °C.	89

Lista de Figuras (Continuación)

Figura	pág.
19. Diagrama de bifurcación para el sistema anaeróbico con agitación en la fermentación con <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . $F_g = 400$ L/h, $N_a = 150$ rpm, $pH = 4$	91
20. Comportamiento de la temperatura durante la fermentación con <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	98
21. Comportamiento de la velocidad de agitación durante la fermentación con <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99
22. Comportamiento de la presión parcial de oxígeno durante fermentación con <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99
23. Comportamiento de la presión parcial de dióxido de carbono durante la fermentación con <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	100
24. Comportamiento del pH durante la fermentación con <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	100
25. Tendencia de la concentración de biomasa durante la fermentación con <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	101
26. Evolución de la concentración de biomasa en el tiempo.	109
27. Evolución del pH en el tiempo.	110
28. Esquema del método de diseño convencional de biorreactores continuos de tanque agitado.	116
29. Índices de Impacto Ambiental Potencial para el proceso de fermentación diseñado con el método convencional y con el método modificado.	123
30. Esquema estrategia integral de diseño de biorreactores continuos de tanque agitado.	126

RESUMEN

En este trabajo, se formula una estrategia integral de diseño de biorreactores con el objeto de obtener procesos más eficientes desde un punto de vista técnico, energético y ambiental. La estrategia incluye una modificación del método convencional de diseño de biorreactores continuos de tanque agitado, en el cual las condiciones de operación se determinan con base en el análisis de estabilidad del biosistema.

Los procesos de fermentación para la producción de etanol con la bacteria *Zymomonas mobilis*, y la levadura *Saccharomyces cerevisiae* fueron estudiados. Se analizó el efecto de la velocidad de dilución y la concentración de sustrato en la alimentación sobre la estabilidad de ambos sistemas. También, se analizó el efecto de la velocidad de flujo volumétrico de gas, la velocidad de agitación, el pH y la temperatura sobre la transferencia de masa en un sistema anaeróbico con agitación, con el fin de evaluar el comportamiento del fenómeno de desorción de CO₂ en la fermentación con *Saccharomyces cerevisiae*. Para el análisis de estabilidad de los sistemas se implementó un método de optimización global en General Algebraic Modeling System GAMS en interfase con Matlab. También se utilizó el Aspen Custom Modeler (ACM) para modelar y simular el proceso de fermentación con el fin de determinar el comportamiento del sistema ante perturbaciones en los parámetros durante la operación.

Un proceso de fermentación para producción de etanol con *Saccharomyces cerevisiae* se diseñó utilizando el método convencional de diseño de biorreactores. Las condiciones de operación determinadas se compararon con las establecidas para el mismo sistema con el método modificado. La productividad, el consumo de energía por agitación, el consumo de

fluido de servicio para transferencia de calor, y el impacto ambiental potencial se utilizaron como criterio para establecer el diseño que garantiza el mejor desempeño del proceso. Los resultados indicaron que, con la nueva estrategia de diseño, es posible definir condiciones de operación apropiadas que garantizan el alcance y mantenimiento de un estado estable de alta productividad, en equilibrio con un razonable consumo de energía, y de fluidos de servicio.

Palabras clave: producción de etanol, multiplicidad de estados estacionarios, diseño de biorreactores, modelamiento y simulación de bioprocesos, análisis de estabilidad.

ABSTRACT

In this work, an integral strategy to design bioreactors is formulated in order to obtaining technically, energetically and environmentally more efficient processes. The strategy includes a modification of the conventional method to design continuous stirred tank bioreactors, in which the operation conditions are determined based on the stability analysis of the biosystem.

The fermentation processes for ethanol production with the bacteria *Zymomonas mobilis*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* were studied. It was analyzed the effect of the dilution rate and the feed substrate concentration on stability of both systems. Also, the effect of the gas volumetric flowrate, the agitation rate, the pH and the temperature on the mass transfer was analyzed in an anaerobic system with agitation, with the purpose of evaluating the behavior of the CO₂ desorption phenomenon in the fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. A global optimization method was implemented in General Algebraic Modeling System (GAMS) in interface with Matlab to execute the stability analysis of the systems. Also the Aspen Custom Modeler (ACM) was used to model and to simulate the fermentation process with the purpose of determining the system behavior when the parameters are perturbed during the operation.

A fermentation process for ethanol production with *Saccharomyces cerevisiae* was designed using the conventional method for biorreactor design. The determined operation conditions were compared with the established ones for the same system with the modified method. The productivity, the energy consumption for agitation, the consumption of service fluid for heat transfer, and the potential environmental impact were used as criteria to

define the design that guarantees the process with best performance. The results indicated that, with the new design strategy, it is possible to define appropriate operation conditions that guarantee the reach and maintenance of a high productivity stable state in balance with reasonable energy and service fluids consumption.

Keywords: ethanol production, steady state multiplicity, bioreactors design, bioprocess modeling and simulation, stability analysis.

INTRODUCCIÓN

“La vida sin fe es un oasis sin agua.”

Roberto Gervaso

Recientemente, en las plantas productoras de alcohol carburante, se observó que los biorreactores diseñados e implementados, durante el arranque no cumplieron con los perfiles de operación para los cuales fueron diseñados. Igualmente, en plantas productoras de etanol y de vacunas (Granados, 2008), que han funcionado por algún tiempo, se ha visto que durante su operación se generan paradas no planeadas de los biorreactores, existe un elevado consumo de energía, hay producción adicional de residuos, y el régimen de operación pasa a otro estado estacionario provocando disminución en el rendimiento del proceso.

Otros problemas ocurren durante el arranque del biorreactor. La estabilización del sistema puede tomar entre 50 y 70 horas (Bothast and Schlicher, 2005), ó el sistema no alcanza el estado estacionario esperado. Así mismo, en grandes plantas productoras de etanol donde el proceso se lleva a cabo en un grupo de cuatro a seis reactores en serie, las concentraciones de sustrato residual, de etanol y de biomasa oscilan alrededor de un valor promedio en las corrientes de salida de los primeros biorreactores, y a medida que el caldo de cultivo circula a través de la batería de fermentadores, las oscilaciones se atenúan hasta alcanzar un estado estable. Sin embargo, este fenómeno generalmente pasa inadvertido (Bai, 2007).

Todo esto ha ocasionado para estas industrias pérdidas económicas que en algunos casos las hacen no productivas debido a que los cambios y fluctuaciones también se reflejan en los sistemas de control, de transferencia de calor y de separación. La causa más probable de

tales inconvenientes es el desconocimiento del comportamiento de los estados estacionarios del sistema durante el diseño de los biorreactores.

Debido a que los biosistemas exhiben un comportamiento no-lineal a causa de la complejidad de las células (Xiu et al., 2002), y a su interacción con el medio, la operación y el control de los biorreactores donde se llevan a cabo bioprocesos, tales como fermentaciones, están limitados por la ocurrencia de multiplicidad de estados estacionarios y bifurcaciones, que afectan los rendimientos de producción. Un caso particular que ha sido estudiado es la producción de etanol (Bai, 2007; Elnashaie and Garhyan, 2005; Garhyan and Elnashaie, 2004a; Garhyan and Elnashaie, 2004b; Garhyan and Elnashaie, 2004c; Garhyan and Elnashaie, 2005; Garhyan et al., 2003; Ribas et al., 2006; Zhao and Bai, 2009).

Los resultados obtenidos por varias investigaciones acerca del modelamiento de biorreactores continuos indican que las condiciones de operación del biorreactor están determinadas por el comportamiento del sistema en estado estable y en modo dinámico (Alford, 2006). Sin embargo, el diseño tradicional de estos equipos se fundamenta en la experimentación y en la solución de los balances de materia del biorreactor en estado estable, donde no se tiene un panorama completo de la estabilidad del sistema.

Los estudios que se han realizado acerca de estabilidad de sistemas bioquímicos se han enfocado en ajustar modelos que reproduzcan los fenómenos de estabilidad que reportan los estudios experimentales. Se han propuesto diferentes clases de relaciones teóricas para describir el crecimiento microbiano. Los modelos en general se basan en balances de materia para la concentración de sustrato, biomasa y producto. Comúnmente se encuentran estudios donde se analiza el efecto de la velocidad de dilución y de la concentración de sustrato en la alimentación sobre la estabilidad de estos sistemas, sin embargo, el efecto de otros parámetros tales como el pH, y la velocidad de agitación, se ha considerado solo en casos aislados.

Además, muchos de los estudios de estabilidad de biorreactores continuos de tanque agitado se dirigen a caracterizar los fenómenos de estabilidad que muestra el modelo, pero no concluyen rangos de los parámetros de operación donde se debe operar el proceso con el fin de mantener el sistema en un estado estable deseado.

En conclusión, el método tradicional de diseño de biorreactores no integra aspectos de estabilidad durante los cálculos técnicos y energéticos que se llevan a cabo. Esto conlleva a que procesos ya implementados en planta no cumplan con los estándares de operabilidad, productividad y calidad que exigen el consumidor, la industria, el medio ambiente y las entidades reguladoras.

Con base en lo anterior, se planteó la ejecución de este trabajo a partir de la siguiente hipótesis:

El desarrollo de un método de diseño para biorreactores continuos, que incluya en forma integral el análisis del comportamiento de estado estacionario y transitorio del sistema cuando parámetros de operación cambian, permitirá obtener procesos biotecnológicos más eficientes y confiables en cuanto a operabilidad, calidad, consumo de energía y amigabilidad con el medio ambiente.

Para comprobar la hipótesis se formuló como objetivo general:

Desarrollar un método de diseño de biorreactores continuos de tanque agitado aplicados a procesos de fermentación, que integre el análisis de los estados estacionarios del sistema biorreaccionante con el fin de que su operación sea más eficiente técnica, energética y ambientalmente.

El cual comprendía los siguientes objetivos específicos:

Establecer un modelo teórico que determine la relación entre el comportamiento dinámico de biorreactores continuos de tanque agitado

aplicados a procesos de fermentación, en función del pH, la velocidad de dilución y la velocidad de agitación, con el fin de determinar el efecto de las variables sobre los estados estacionarios del sistema.

Desarrollar el análisis de estabilidad a las ecuaciones que modelan el comportamiento dinámico de biorreactores continuos de tanque agitado.

Generar una estrategia integral de simulación para procesos de fermentación continua aplicados a la producción de etanol.

Para el cumplimiento de los objetivos, dos sistemas fueron estudiados como objeto de trabajo: la producción de alcohol por fermentación anaeróbica con la bacteria *Zymomonas mobilis*, y por la fermentación anaeróbica con la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Se analizó el efecto de la velocidad de dilución y la concentración de sustrato en la alimentación sobre la estabilidad de ambos sistemas. También, se analizó el efecto de la velocidad de flujo volumétrico de gas, la velocidad de agitación, el pH y la temperatura sobre la transferencia de masa en un sistema anaeróbico con agitación, con el fin de evaluar el comportamiento del fenómeno de desorción de CO₂ en la fermentación con *Saccharomyces cerevisiae*. Para cada sistema particular se estableció un modelo teórico que determina la relación entre el comportamiento dinámico del biorreactor en función de los parámetros de interés.

Partiendo de los balances de materia y las relaciones matemáticas auxiliares que modelan el biorreactor, se efectuó el análisis de estabilidad de los estados estacionarios del sistema. Este análisis comprendió:

- La determinación de múltiples estados estacionarios, mediante un método de optimización global programado en *General Algebraic Modeling System GAMS*.
- La caracterización de los estados estacionarios respecto a su estabilidad con un algoritmo programado en Matlab.
- La determinación de la influencia de los parámetros de operación sobre la estabilidad de cada sistema estudiado. Esto se evaluó mediante la construcción de

diagramas de bifurcación utilizando *GAMS* y *Matlab*. La respuesta dinámica del sistema se evaluó por simulación dinámica en *Matlab*. Así mismo, se determinó el comportamiento del sistema de fermentación con *Zymomonas mobilis* ante perturbaciones en los parámetros durante operación en planta por modelamiento y simulación en *Aspen Custom Modeler* (ACM).

A partir de los resultados del análisis de los estados estacionarios del sistema, se evaluó el desempeño del proceso desde el punto de vista de estabilidad. Mediante el análisis de los diagramas de bifurcación se establecieron rangos permitidos para las variables de operación, y se evaluó la factibilidad de obtener estados estacionarios estables de alta productividad, y las condiciones bajo las cuales pueden alcanzarse y mantenerse.

Después de establecidos los rangos viables técnicamente de las variables de operación, se procedió a una comparación con una fermentación diseñada por el método convencional. La selección del mejor proceso se restringió a indicadores de rendimiento, conversión, productividad, consumo de potencia para agitación, consumo de fluido de servicio para enfriamiento e índice de impacto ambiental.

El impacto ambiental se determinó con la aplicación del algoritmo de reducción de residuos WAR, desarrollado por la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA); el cual se basa en los balances de materia del proceso y en índices de toxicidad de las sustancias involucradas (Hilaly and Sikdar, 1995).

Para la síntesis del método completo de diseño de biorreactores se recopilaron las etapas desarrolladas para ambos sistemas estudiados, y se especificaron los lazos de retroalimentación de información que se requieren para la determinación de las condiciones de operación más viables. Todo se basa en comparación de los resultados de los análisis de estabilidad, de viabilidad operacional, consumo energético e impacto ambiental para las alternativas de operación que surgen para el proceso. Las predicciones del sistema anaeróbico con agitación para la fermentación con *Saccharomyces cerevisiae* se validaron experimentalmente en un biorreactor a escala de laboratorio.

REFERENCIAS

1. Alford J.S. (2006) Bioprocess control: Advances and challenges. *Computers & Chemical Engineering* 30:1464-1475.
2. Bai F. (2007) Process oscillations in continuous ethanol fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*, University of Waterloo, Waterloo. pp. 218.
3. Bothast R.J., Schlicher M.A. (2005) Biotechnological processes for conversion of corn into ethanol. *Applied Microbiology and Biotechnology* 67:19-25.
4. Elnashaie S.S.E.H., Garhyan P. (2005) Chaotic fermentation of ethanol, United States Patent Application Publication, US2005/0170483 A1, United States. pp. 74.
5. Garhyan P., Elnashaie S.S.E.H. (2004a) Utilization of mathematical models to investigate the bifurcation and chaotic behavior of ethanol fermentors. *Mathematical and Computer Modelling* 39:381-427.
6. Garhyan P., Elnashaie S.S.E.H. (2004b) Static/Dynamic Bifurcation and Chaotic Behavior of an Ethanol Fermentor. *Industrial and Engineering Chemical Research* 43:1260-1273.
7. Garhyan P., Elnashaie S.S.E.H. (2004c) Bifurcation analysis of two continuous membrane fermentor configurations for producing ethanol. *Chemical Engineering Science* 59:3235-3268.
8. Garhyan P., Elnashaie S.S.E.H. (2005) Experimental Investigation and Confirmation of Static/Dynamic Bifurcation Behavior in a Continuous Ethanol Fermentor. Practical Relevance of Bifurcation and the Contribution of Harmon Ray. *Industrial and Engineering Chemical Research* 44:2525-2531.
9. Garhyan P., Elnashaie S.S.E.H., Al-Haddad S.M., Ibrahim G., Elshishini S.S. (2003) Exploration and exploitation of bifurcation/chaotic behavior of a continuous fermentor for the production of ethanol. *Chemical Engineering Science* 58:1479-1496.
10. Granados J.M. (2008) Producción de biológicos veterinarios en VECOL S.A, III Congreso Colombiano de Biotecnología, Bogotá, Colombia. .

11. Hilaly A.K., Sikdar S.K. (1995) Pollution balance method and the demonstration of its application to minimizing waste in a biochemical process. *Industrial and Engineering Chemical Research* 34:2051–2059.
12. Ribas M., Hurtado R., Garrido N., Díaz de los Ríos M., Doménech F., Sabadí R., García T., Rodríguez D. (2006) Modelación matemática y simulación de procesos fermentativos. *Ingeniería Química*:118-125.
13. Xiu Z.-L., Song B.-H., Sun L.-H., Zeeng A.-P. (2002) Theoretical analysis of effects of metabolic overflow and time delay on the performance and dynamic behavior of a two-stage fermentation process. *Biochemical Engineering Journal* 11:101–109.
14. Zhao X.Q., Bai F.W. (2009) Mechanisms of yeast stress tolerance and its manipulation for efficient fuel ethanol production. *Journal of Biotechnology* 144:23-30.

CAPITULO 1

ESTABILIDAD DE BIORREACTORES CONTINUOS DE TANQUE AGITADO PARA PRODUCCIÓN DE ETANOL: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

*“Soñar de noche y madrugar a trabajar
para convertir los sueños en realidad.”*

Álvaro Uribe Vélez

El desempeño de los biorreactores depende casi en su totalidad del microorganismo que se selecciona para obtener el producto de interés. Aunque la productividad del proceso está relacionada con la optimización de los parámetros de operación del equipo, la célula es la entidad donde se desarrolla toda la actividad de manufactura. Debido a que la producción depende de la población de microorganismos empleada en el proceso, el ambiente donde las células se cultivan debe proporcionar lo necesario para que ellas rindan los resultados esperados.

La selección de un microorganismo para un proceso, en primer grado, está sujeta a que éste satisfaga las condiciones mínimas de producción. En la industria del etanol, así como en otros procesos, un requisito esencial para el microorganismo es un alto rendimiento del producto. Sin embargo, esta condición no garantiza el buen desempeño del biorreactor y, menos aún, una alta productividad del proceso. Cuando se selecciona un microorganismo, varias de sus propiedades, en relación con el caldo de cultivo, se deben analizar. Entre ellas están la variedad de sustratos que puede consumir, las condiciones de temperatura y pH a

las cuales puede operar, los requerimientos de oxígeno, la tolerancia al producto y al sustrato, y la producción de coproductos, entre otras.

Varios microorganismos se han explorado para la producción de etanol, la levadura *Saccharomyces cerevisiae* es la especie que prima. La bacteria *Zymomonas mobilis* también se ha estudiado bastante durante las últimas décadas, y algunos investigadores sugieren que reemplace la levadura debido a que posee algunas características interesantes. Las principales características de estos dos microorganismos se resumen en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Propiedades y condiciones de operación reportados para cultivos de *S. cerevisiae* y *Z. mobilis*.

<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Zymomonas mobilis</i>	Referencia
Utiliza variedad de sustratos: glucosa, maltosa, galactosa, fructosa y sacarosa.	Utiliza principalmente glucosa. El uso de sacarosa conlleva a la producción de altas cantidades de coproductos.	(Kosaric and Vardar-Sukan, 2001)
pH _{operación} = 3.5 – 6.0 T _{operación} = 28 – 35 °C	pH _{operación} = 4.0 – 5.0 T _{operación} = 30 – 40 °C	
Inhibición por sustrato a concentraciones por encima de 150 g/L.	Para cepas comunes, crecimiento normal hasta 100 g/L de glucosa. Cepas modificadas toleran hasta 400 g/L.	(Favela, 2005; Lenbury et al., 1999)
Inhibición completa por etanol a concentraciones mayores a 110 g/L.	Inhibición por etanol a partir de concentraciones mayores a 60 g/L.	(Bafrcova et al., 1999; Brown et al., 1981; Laopaiboon et al., 2009; Thomas et al., 1996)
Requiere oxígeno: 0.05 – 0.1 mmHg. Valores mas altos promueven el crecimiento celular.	Completamente anaeróbico.	(Kosaric and Vardar-Sukan, 2001)
Rendimiento teórico: 0,51 g etanol/g glucosa.	Rendimiento teórico: 0.49 g etanol/g glucosa.	(Claasen et al., 1999; Ingledew, 1999; Lee et al., 1980a)
Rendimiento en la práctica: 90 – 95 % del valor teórico, debido a la síntesis de biomasa y reacciones para mantenimiento.	Rendimiento en la práctica: 97% del máximo teórico.	
Principal coproducto: glicerol (1 %p/v). Otros: ácidos orgánicos y alcoholes más pesados.	Coproductos: altas cantidades de ácidos orgánicos (ácidos acético y láctico principalmente)	(Favela, 2005)

Todas las propiedades de los microorganismos afectan, de alguna manera, la eficiencia de los bioprocesos. Los microorganismos utilizados poseen ventajas y desventajas, y el buen desempeño de las fermentaciones depende del equilibrio entre cada uno de los factores que intervienen en el proceso. Otra de las características que más afectan la eficiencia de las fermentaciones alcohólicas es el comportamiento dinámico de los sistemas. Las propiedades bioquímicas del microorganismo definen la respuesta dinámica frente a las condiciones ambientales, determinan las condiciones de operación y, en consecuencia, afectan los indicadores de producción y la economía del proceso.

1.1 ESTABILIDAD DE SISTEMAS CONTINUOS

En procesos de fermentación, los biorreactores deben proveer un ambiente controlado para el crecimiento de los microorganismos; no obstante, el estado de un reactor bioquímico está determinado por parámetros físicos, químicos, bioquímicos y biológicos (Ver **Tabla 2**), que afectan permanentemente la actividad biológica de las células. De esta manera, los sistemas bioquímicos son muy sensibles al medio al que se exponen, y en consecuencia, se presentan variaciones en su estabilidad. Por esta razón, los procesos que involucran sistemas bioquímicos exhiben comportamientos atípicos en las variables de salida. Se ha determinado que más de 13 microorganismos incluyendo levaduras, bacterias, hongos y algas exhiben comportamiento oscilatorio durante los cultivos continuos (Xiu et al., 2002).

Experimentalmente se ha demostrado que durante la operación de biorreactores de tanque agitado continuos, se presentan fenómenos característicos de los sistemas no lineales, tales como multiplicidad de estados estacionarios para un grupo de parámetros (Dibiasio et al., 1981; Lee and Lim, 1999), oscilación de algunas variables de proceso (Henson, 2003; Jöbses et al., 1985; Jöbses et al., 1986; Parulekar et al., 1986; Zhang et al., 2002), bifurcaciones (Henson, 2003; Lei et al., 2001; Ramaswamy et al., 2005; Zhang et al., 2002), y caos (Garhyan and Elnashaie, 2004b). En general, estos fenómenos no lineales, los cuales

están directamente relacionados con la complejidad de las células, en la mayoría de los casos, disminuyen la productividad del proceso.

Tabla 2. Parámetros de operación que afectan los sistemas bioquímicos.

	Parámetros	Función
Físicos	Volumen del caldo, potencia de agitación, velocidad de transferencia de calor, velocidad de alimentación del líquido, velocidad de flujo de gas, velocidad de dilución, etc.	Describen el funcionamiento mecánico del equipo
Químicos	Concentraciones de sustrato, de productos, de dióxido de carbono, de oxígeno, y de nutrientes, conductividad, pH, etc.	Definen el ambiente químico dentro del reactor
Bioquímicos	Contenido de aminoácidos, de ATP/ADP, de carbohidratos, de enzimas, de NAD/NADH, de ácidos nucleicos, de proteínas, de vitaminas, etc.	Indican el estado metabólico de la célula durante su crecimiento
Biológicos	Distribución de edad y de tamaño, grado de agregación, de contaminación, y de degeneración, tiempo de duplicación, inestabilidad genética, morfología, mutaciones, cantidad de células viables, etc.	Caracterizan el reactor en términos del comportamiento de la población celular

Con el fin de predecir el comportamiento dinámico que exhiben los sistemas microbianos, se han propuesto varios tipos de modelos para describir el crecimiento celular. En general, tales modelos se clasifican en: no estructurados, estructurados (Jöbses et al., 1985; Jöbses et al., 1986; Namjoshi et al., 2003; Namjoshi and Ramkrishna, 2001; Ramkrishna, 2003), no segregados y segregados (Henson, 2003; Strässle et al., 1988; Strässle et al., 1989; Zhang et al., 2002). Además, las cinéticas de crecimiento se han modificado con el objeto de tener en cuenta los efectos de inhibición que sufren los microorganismos por altas concentraciones de sustrato y producto. Se han propuesto varias expresiones, hay de tipo lineal, exponencial, parabólico e hiperbólico (Lenbury et al., 1999). El análisis del comportamiento dinámico se ha llevado a cabo experimental y teóricamente para sistemas microbianos específicos; entre ellos los procesos de fermentación para producción de alcohol por *Saccharomyces cerevisiae* (Henson, 2003; Lei et al., 2001; Strässle et al., 1988; Strässle et al., 1989; Zhang et al., 2002) y *Zymomonas mobilis* (Daugulis et al., 1997; Garhyan and Elnashaie, 2004b;

Ghommidh et al., 1989; Jarzebski, 1992; Jöbses et al., 1985; Jöbses et al., 1986; McLellan et al., 1999). Además hay reporte de estudios dinámicos para biorreactores con cultivos de microorganismos para tratamiento con lodos activados de sustancias como residuos fenólicos y fuentes de carbono inhibitorias (Ajbar, 2001; Ajbar and Ibrahim, 1997; D'Adamo et al., 1984; Rozich et al., 1985), cultivos recombinantes (Ajbar, 2002), y producción de ácido láctico (Lee and Lim, 1999; Nielsen et al., 1991a; Nielsen et al., 1991b), entre otros.

En las investigaciones se ha evaluado la influencia de diferentes parámetros de proceso sobre la estabilidad del sistema. Las más estudiadas son la velocidad de dilución, la concentración de sustrato en la alimentación, y en algunos casos el pH (Lee and Lim, 1999) y la temperatura (Jöbses et al., 1985; Jöbses et al., 1986), entre otras. Así mismo se ha evaluado el comportamiento dinámico de sistemas con configuraciones de operación específicas como biorreactores con aireación (Agrawal et al., 1982; Pinheiro et al., 2004), con alimentación lateral de biomasa y producto (Lee and Lim, 1999), con reciclo de células (Ajbar and Gamal, 1997), con consumo de sustratos sustituibles (Ajbar and Alhumaizi, 2000), con extracción con solvente (Bruce et al., 1991) y extracción con membranas del producto inhibitorio (Garhyan and Elnashaie, 2004a), y de biorreactores *biofilm* en los que se consideran efectos difusivos (Wik et al., 2006).

En este capítulo se presentan aspectos relevantes sobre la estabilidad del proceso de fermentación para la obtención de bioetanol con los microorganismos *Saccharomyces cerevisiae* and *Zymomonas mobilis* con el propósito de entender los fenómenos que afectan la productividad de los bioprocesos en general.

1.2 ESTABILIDAD DE SISTEMAS CONTINUOS PARA PRODUCCIÓN DE ETANOL

Zymomonas mobilis y *Saccharomyces cerevisiae* son algunos de los microorganismos más estudiados para producir etanol a escala industrial. Los cultivos de estos microorganismos en biorreactores continuos de tanque agitado, durante los procesos a pequeña y gran escala, presentan cambios en su estabilidad que dificultan el control del proceso y afectan la productividad. Tales comportamientos obedecen a fenómenos característicos de los sistemas no lineales (Dibiasio et al., 1981).

En cultivos continuos de *Zymomonas mobilis*, se observa multiplicidad de estados estacionarios y oscilación de diferentes variables de proceso (concentraciones de sustrato, de biomasa y de productos, y viabilidad de las células, entre otras) para ciertos valores de la concentración de sustrato en la alimentación y de la velocidad de dilución. En algunos casos, estos comportamientos causan que la concentración de biomasa y la viabilidad de las células se reduzcan en más de un 50% (Ghommith et al., 1989; Jöbses et al., 1986), o que la productividad del proceso sea muy baja. Por ejemplo, en fermentaciones continuas alimentadas con altas concentraciones de sustrato (entre 134 y 295 Kg/m³) se presentan grandes variaciones en las concentraciones de biomasa y producto debido al fenómeno oscilatorio. Cuando este fenómeno se controla, la productividad promedio del proceso alcanza los 15.6 Kg/m³ h. Sin embargo, cuando el fenómeno no se regula, la productividad del proceso cae a 4.6 Kg/m³ h (Bruce et al., 1991).

En general, en cultivos de esta bacteria, se ha determinado que para valores de la velocidad de dilución entre 0 y 2.5 h⁻¹, y para concentraciones de sustrato en la alimentación entre 100 y 200 Kg/m³, el sistema puede presentar diferentes regiones de estabilidad en las cuales se presenta multiplicidad de estados estacionarios y/o oscilaciones. En los casos simples, las oscilaciones terminan en una bifurcación de período infinito, y en los casos más complejos, la rama periódica bifurca en caos totalmente desarrollado. Así mismo se observa que, en algunos casos, la concentración promedio de etanol obtenida durante la oscilación es mayor

que la correspondiente al estado estacionario alrededor del cual oscila (Garhyan and Elnashaie, 2004b; Garhyan et al., 2003).

En cultivos continuos de *Saccharomyces cerevisiae* también se presentan multiplicidad estados estacionarios y comportamiento oscilatorio. Para bajas concentraciones de sustrato en la alimentación, prevalece solo un estado estacionario; sin embargo, para altas concentraciones de glucosa alimentada, pueden aparecer múltiples estados estacionarios sobre un rango relativamente amplio de velocidades de dilución (Lei et al., 2001). Por ejemplo, para una concentración de sustrato alimentada de 30 Kg/m³, y bajas velocidades de dilución, el sistema exhibe solamente un estado estacionario estable. A medida que la velocidad de dilución se incrementa, ocurre una bifurcación donde el estado estacionario estable se vuelve inestable y aparece una solución periódica estable con oscilación. Esta bifurcación está acompañada por oscilaciones de gran amplitud. La solución periódica estable existe con la solución de estado estacionario inestable para un intervalo amplio de velocidades de dilución. A media que la velocidad de dilución se incrementa más, ocurre una segunda bifurcación, la solución periódica desaparece, y la solución de estado estacionario recupera su estabilidad. Esta bifurcación se caracteriza por oscilaciones de pequeña amplitud (Henson, 2003).

Las tecnologías *very high gravity* (VHG) para producción de etanol, en las cuales se utilizan medios que contienen más del 25% (p/v) de azúcar para lograr concentraciones de etanol por encima de 15% (p/v), han generado gran interés para la producción de etanol a partir de pentosas. Durante su operación, se observan cuasi estados estacionarios, y oscilación de las variables de proceso (Bai, 2007; Bai et al., 2004)

Por otro lado, en el proceso de obtención de etanol a partir de materiales lignocelulósicos, la levadura se expone a trazas de sustancias inhibitorias o tóxicas, tales como furfural y ácido acético, que provienen de la materia prima en sí, o del proceso de hidrólisis de la hemicelulosa, las cuales pueden ser causa de perturbación para la estabilidad del sistema (Garay-Arroyo et al., 2004; Zhao and Bai, 2009).

Puesto que la mayoría de las fermentaciones realizadas a escala de laboratorio usan bajas concentraciones de glucosa en la alimentación, múltiples estados estacionarios raramente se reportan en trabajos experimentales. No obstante, debido a que la mayoría de las fermentaciones en la industria se llevan a cabo a altas concentraciones de sustrato, este fenómeno tiene mayor relevancia a escala industrial.

1.3 COMPORTAMIENTO OSCILATORIO

Las oscilaciones en la concentración de biomasa, sustrato y producto (etanol) es un fenómeno común que se observa en cultivos continuos de *Zymomonas mobilis* (Bruce et al., 1991; Ghommidh et al., 1989; Jöbses et al., 1986; Lee et al., 1979; Lee et al., 1980b; McLellan et al., 1999) y de *Saccharomyces cerevisiae* (Daugulis et al., 1997; Münch et al., 1992; Perego Jr et al., 1985; Strässle et al., 1988; Strässle et al., 1989). Este comportamiento espontáneo se presenta, incluso, cuando las condiciones en la alimentación y los parámetros físicos como temperatura, velocidad de agitación, y pH, entre otros, se mantienen constantes (Parulekar et al., 1986; Porro et al., 1988).

Durante el comportamiento oscilatorio se distinguen períodos de tiempo en los cuales hay una disminución en la productividad del etanol y se presenta una alta cantidad de sustrato residual. Esto indica una pérdida de sustrato, que es inaceptable para las fermentaciones continuas a escala industrial debido al alto gasto que representa el costo del sustrato en la producción global de etanol (Daugulis et al., 1991). Así mismo, éste fenómeno afecta desfavorablemente los esfuerzos por optimizar la operación de biorreactores continuos. Por ello, se ha considerado importante investigar los factores que causan dicho fenómeno, con el fin de sugerir estrategias para eliminarlo o controlarlo, o determinar si ofrece algún beneficio.

Durante la década de los años 80 fue de gran interés evaluar si las oscilaciones sostenidas eran inherentes al cultivo continuo, o si se presentaban como un mecanismo de los sistemas de control que se utilizaban para regular el pH, la concentración de oxígeno disuelto u otras variables de proceso. Algunas investigaciones (Parulekar et al., 1986) determinaron que las oscilaciones estaban ligadas a la cinética de crecimiento del microorganismo. Jöbses (Jöbses et al., 1986) relacionó el comportamiento oscilatorio con el fenómeno de inhibición por producto. Bruce (Bruce et al., 1991) estableció que las oscilaciones son consecuencia del efecto aditivo de las inhibiciones por sustrato y por producto. Finalmente, debido a que la concentración más alta de sustrato que se observa durante las oscilaciones, comúnmente, no alcanza el nivel considerado como perjudicial para los microorganismos, Jarzebski (Jarzebski, 1992) sugirió que la concentración de glucosa a la cual *Z. mobilis* experimenta inhibición por sustrato puede depender de la concentración de etanol. Al revisar datos experimentales, él observó, como característica común, que las oscilaciones ocurren cuando las concentraciones de sustrato en la alimentación son suficientemente altas, mientras que a bajas concentraciones de sustrato los sistemas tienden a su estado estable. Esta tendencia se observa en los resultados obtenidos por Perego (Perego Jr et al., 1985) para *Saccharomyces cerevisiae*, y por Jöbses (Jöbses et al., 1986) y Lee (Lee et al., 1979; Lee et al., 1980b) para *Zymomonas mobilis*.

1.4 EFECTO DE LOS PARÁMETROS DE OPERACIÓN SOBRE LA OCURRENCIA DE OSCILACIONES

La magnitud de algunos parámetros, tales como la velocidad de dilución y la concentración de sustrato en la alimentación, influye sobre el comportamiento estático y dinámico de los fermentadores continuos de tanque agitado. De estos, y de otros parámetros de operación tales como la temperatura, depende la aparición de fenómenos de estabilidad que afectan la conversión de sustrato, el rendimiento de etanol y la productividad del proceso (Garhyan and Elnashaie, 2004a; Garhyan and Elnashaie, 2004b; Jöbses et al., 1986; Perego Jr et al., 1985).

En cultivos continuos de *Zymomonas mobilis*, el principal factor que contribuye al comportamiento oscilatorio es el retraso en la respuesta de las células a un cambio en el ambiente, por ejemplo, a una variación en la velocidad de cambio en la concentración de etanol. Por lo tanto, operar un biorreactor a bajas velocidades de dilución favorece la aparición de oscilaciones. Mientras que, cuando se trabaja a altas velocidades de dilución, las oscilaciones rápidamente se amortiguan (Ghommidh et al., 1989).

Así mismo, las condiciones ambientales, de alimentación y del cultivo influyen la estabilidad y afectan los indicadores de producción de las fermentaciones con *Saccharomyces cerevisiae*. En cultivos aeróbicos, las oscilaciones existen en un rango definido de velocidades de dilución y de concentraciones de oxígeno disuelto (Porro et al., 1988). La localización y la amplitud de los intervalos de estos dos parámetros dentro de los cuales diferentes variables metabólicas exhiben comportamiento oscilatorio dependen de la magnitud de otros parámetros, tales como la concentración de glucosa alimentada. Así, si la concentración de glucosa es muy baja, durante la transición de operación discontinua a operación continua se producen oscilaciones (Parulekar et al., 1986). Igualmente, el comportamiento oscilatorio en cultivos continuos en estado estacionario se induce al disminuir significativamente la concentración de glucosa mediante una reducción temporal de la velocidad de dilución. Estas oscilaciones se pueden eliminar incrementando o disminuyendo el porcentaje de oxígeno disuelto por encima o por debajo de los valores críticos, al manipular la velocidad de agitación (Porro et al., 1988).

En cultivos anaeróbicos la acción inhibitoria del etanol conduce a estados inestables. Esta acción depende de la concentración de producto, de la velocidad de dilución y de la concentración de sustrato alimentada (Perego Jr et al., 1985). A altas velocidades de dilución, para un amplio rango de concentraciones de sustrato en la alimentación (incluyendo limitación por sustrato) predominan oscilaciones lentamente amortiguadas. A bajas velocidades de dilución, el efecto de la concentración de sustrato alimentada es más pronunciado y se observan oscilaciones sostenidas o oscilaciones fuertemente amortiguadas

(Jarzebski, 1992). En general, las interacciones entre el sustrato limitante y los microorganismos pueden provocar comportamientos dinámicos muy complejos para rangos específicos de los parámetros (Lenbury et al., 1999). La **Tabla 3** resume los efectos de algunos parámetros de operación para los dos sistemas productores de etanol.

1.4.1 Regulación de las Oscilaciones

A partir del estudio de la estabilidad de los procesos, se pueden determinar las condiciones de operación con las cuales es posible evitar los fenómenos de estabilidad que afectan desfavorablemente el rendimiento de la fermentación. Igualmente, se pueden desarrollar estrategias de control para mantener una alta productividad (Henson, 2003; Ramaswamy et al., 2005; Szederkényi et al., 2002). O se pueden diseñar nuevos esquemas de proceso en el cual operaciones de separación se integran al biorreactor con el fin de estabilizar el sistema. Este es el caso de fermentadores para producción de etanol a los cuales se integra la operación de extracción con solvente o con membrana con el objeto de retirar el producto, y así evitar el efecto inhibitorio del etanol sobre los microorganismos que causa las oscilaciones. Ambas tecnologías se han aplicado con éxito en la producción de etanol con *Saccharomyces cerevisiae* y *Zymomonas mobilis*. La remoción continua e *in situ* del producto inhibitorio trae consigo algunas ventajas, permite el alcance de altas velocidades de reacción, reduce costos de recuperación de producto, y facilita la operación con altos volúmenes de producción (Paz and Cardona, 2007).

Tabla 3. Influencia de parámetros de operación en la aparición de oscilaciones en sistemas productores de etanol.

Parámetro	Nivel	Cultivos de <i>S. cerevisiae</i>		Cultivos de <i>Z. mobilis</i>
		Aeróbico	Anaeróbico	
Temperatura	Moderada	---	---	Evita aparición de oscilaciones
	Alta	Afecta la velocidad específica de crecimiento de la levadura y la respuesta del sistema	---	Incrementa el efecto inhibitorio del etanol. Induce oscilaciones
Velocidad de dilución	Baja	Inducción a oscilaciones	Efecto pronunciado de C_{Sf} . Oscilaciones sostenidas o fuertemente amortiguadas. Oscilaciones de grande amplitud.	Favorece la aparición de oscilaciones
	Alta	---	Para varios C_{Sf} , oscilaciones suavemente amortiguadas. Oscilaciones de pequeña amplitud.	Las oscilaciones se amortiguan rápidamente
Concentración de sustrato alimentado	Baja	Produce oscilaciones la transición de operación discontinua a continua. Inducción de oscilaciones.	Prevalece un estado estacionario	El sistema tiende a un estado estable
	Alta		Múltiples estados estacionarios sobre un rango amplio de D. Oscilaciones de mayor a menor amplitud	Se presentan oscilaciones
Concentración de oxígeno disuelto (velocidad de agitación)	Baja	Existe un rango (de amplitud sujeta al valor de otras variables) dentro del cual se presentan oscilaciones	---	---
	Alta		---	---

En la fermentación extractiva, el uso de un solvente da un grado más de control sobre la operación, ya que la concentración del etanol se puede mantener por debajo del nivel de inhibición al manipular la velocidad de dilución del solvente, sin afectar el rendimiento de

la biomasa y el etanol. En estudios realizados (Gutiérrez et al., 2005) para la producción de alcohol carburante por fermentación extractiva a partir de glucosa y xilosa, se determinó que la adición de un solvente al caldo de fermentación induce una dramática reducción en la concentración de etanol en la fase acuosa, lo que implica una menor inhibición en la velocidad de consumo de sustrato. Se observa que para un proceso de fermentación convencional, la velocidad de crecimiento se inhibe debido a las altas cantidades de etanol en el caldo de cultivo. Esto se refleja en que el consumo total de los azúcares toma 45 horas. Mientras que para una fermentación extractiva ambos sustratos se consumen en 25 horas.

Bruce (Bruce et al., 1991) también demostró el uso de la fermentación extractiva como una técnica eficiente para eliminar el comportamiento oscilatorio que comúnmente exhibe *Zymomonas mobilis* en fermentaciones convencionales. Cuando se extrae etanol con un solvente desde el caldo de cultivo, *Z. mobilis* es capaz de fermentar en continuo materias primas concentradas, y es posible triplicar la producción de etanol.

Similares beneficios se consiguen con extracción mediante membranas, ya que éstas actúan como estabilizadores. La remoción continua del etanol con dichos dispositivos produce un incremento en la productividad, y tiende a estabilizar el sistema debido a que las oscilaciones se eliminan. Cuando se minimiza la inhibición por etanol, la conversión del azúcar, el rendimiento del etanol y la velocidad de producción se favorecen (Garhyan and Elnashaie, 2004a; Garhyan and Elnashaie, 2004b; Garhyan and Elnashaie, 2005; Garhyan et al., 2003). Sin embargo, en algunos casos, cuando se incrementa demasiado el área de la membrana, decrece el rendimiento y la productividad.

1.5 DISCUSIÓN

En general, el diseño, arranque y operación de procesos biotecnológicos a escala industrial, se ha basado en pruebas de ensayo y error, combinadas con pautas teóricas. Esta metodología retrasa el diseño de los procesos de producción, y a largo término, afecta el

buen desempeño de los equipos y de la instrumentación de control. Además, los resultados obtenidos de este método tradicional, establecen condiciones de operación para los biorreactores que no garantizan la mejor productividad del proceso global. Durante la definición de los valores para los parámetros de operación, no se toman en cuenta todos los fenómenos de estabilidad que caracterizan el sistema. Esto suele ocasionar que el proceso no opere dentro de una región estable, lo cual conduce a cambios inesperados en las variables de salida.

La creciente demanda de productos biotecnológicos, tales como el alcohol carburante, requiere de procesos eficientes y altamente productivos. No se puede perder tiempo ni dinero. Sin embargo, aunque muchos de los procesos de fermentación son bastante conocidos, las industrias instaladas presentan varios inconvenientes durante su operación; uno de ellos es la variación inesperada en la concentración de salida de producto, o una drástica caída en la productividad. A menudo, este problema se asocia a la instrumentación de control o a variaciones externas de las variables de operación. Sin embargo, se olvida que la estabilidad del sistema reactante también afecta el desempeño del proceso, y que dicha estabilidad depende de los parámetros de operación.

Es evidente que el método tradicional de diseño de biorreactores, hasta ahora aplicado, no es suficiente para obtener un completo diseño de los procesos de fermentación. Una alternativa para diseñar bioprocesos es la aplicación de un método modificado en el cual se incluya el análisis de estabilidad del sistema, de manera que provea un criterio técnico para la selección de variables de operación, y garantice una productividad deseada. El estudio de la dinámica de los biorreactores aporta información acerca del comportamiento del sistema cultivo-equipos, la cual ayuda a definir las condiciones de operación que favorecen el alcance y el mantenimiento de un estado estable durante el proceso. Así, se evita llevar a cabo la operación del biorreactor cerca de un estado estacionario inestable, o caer en una solución oscilatoria no deseada, y se logra formular políticas de control y optimización efectivas.

La comunidad industrial, tal como los productores de alcohol carburante, deben enfocar su atención en incluir el análisis de estabilidad durante el diseño de sus procesos con el fin de predecir efectivamente el comportamiento del sistema. Las numerosas investigaciones realizadas con el fin de entender el comportamiento exhibido por estos cultivos han sido fundamentales para el avance de la ciencia y la tecnología. El desarrollo de modelos y la evaluación del efecto de variables propias de los cultivos (distribución de población, edad, actividad, etc.) y de condiciones de operación (velocidad de dilución, concentración de sustrato alimentada, concentración de producto, etc.) ya son un camino recorrido. Es el momento de modificar los procedimientos convencionales de diseño de los fermentadores. Es una necesidad, sistematizar un nuevo método para diseñar procesos biotecnológicos que se base en las restricciones de estabilidad que imponen estos sistemas debido a su naturaleza y complejidad.

REFERENCIAS

1. Agrawal P., Lee C., Lim H.C., Ramkrishna D. (1982) Theoretical investigations of dynamic behavior of isothermal continuous stirred tank biological reactors. *Chemical Engineering Science* 37:453-462.
2. Ajbar A. (2001) Stability analysis of the biodegradation of mixed wastes in a continuous bioreactor with cell recycle. *Water Research* 35:1201-1208.
3. Ajbar A. (2002) Classification of static and dynamic behavior in chemostat for plasmid - bearing, plasmid free mixed recombinant cultures. *Chemical Engineering Communications* 189:1130-1154.
4. Ajbar A., Gamal I. (1997) Stability and bifurcation of an unstructured model of a bioreactor with cell recycle. *Mathematical and Computer Modelling* 25:31-48.
5. Ajbar A., Ibrahim G. (1997) Periodic and nonperiodic oscillatory behavior in a model for activated sludge reactors. *Mathematical and Computer Modelling* 25:9-27.

6. Ajbar A., Alhumaizi K. (2000) Biodegradation of substitutable substrates in a continuous bioreactor with cell recycle: a study of static bifurcation. *Mathematical and Computer Modelling* 31:159-174.
7. Bafrcova P., Smogrovicova D., Slavikova I., Patkova J., Domeny Z. (1999) Improvement of very high gravity ethanol fermentation by media supplementation using *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Letters* 21:337-341.
8. Bai F. (2007) Process oscillations in continuous ethanol fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*, University of Waterloo, Waterloo. pp. 218.
9. Bai F.W., Chen L.J., Zhang Z., Anderson W.A., Moo-Young M. (2004) Continuous ethanol production and evaluation of yeast cell lysis and viability loss under very high gravity medium conditions. *Journal of Biotechnology* 110:287-293.
10. Brown S.W., Oliver S.G., Harrison D.E.F., Righelato R.C. (1981) Ethanol inhibition of yeast growth and fermentation: Differences in the magnitude and complexity of the effect. *Applied Microbiology and Biotechnology* 11:151-155.
11. Bruce L.J., Axford D.B., Ciszek B., Daugulis A.J. (1991) Extractive fermentation by *Zymomonas mobilis* and the control of oscillatory behavior. *Biotechnology Letters* 13:291-296.
12. Claasen P.A.M., van Lier J.B., López Contreras A.M., van Niel E.W.J., Sijtsma L., Stams A.J.M., de Vries S.S., Weusthuis R.A. (1999) Utilization of biomass for the supply of energy carriers. *Applied Microbiology and Biotechnology* 52:741 - 755.
13. D'Adamo P.D., Rozich A.F., Gaudy Jr. A.F. (1984) Analysis of growth data with inhibitory carbon sources. *Biotechnology and Bioengineering* 26:397-402.
14. Daugulis A., McLellan P., Li J. (1997) Experimental investigation and modeling of oscillatory behavior in the continuous culture of *Zymomonas mobilis* *Biotechnology and Bioengineering* 56:99-105.
15. Daugulis A.J., Axford D.B., McLellan P.J. (1991) The economics of ethanol production by extractive fermentation. *The Canadian Journal of Chemical Engineering* 69:488-497.

16. Dibiasio D., Lim H.C., Weigand W.A. (1981) An experimental investigation of stability and multiplicity of steady states in a biological reactor. *AIChE Journal* 27:284-292.
17. Favela E. (2005) Producción de alcohol de *Zymomonas mobilis*, in: M. García (Ed.), *Biotecnología Alimentaria*, Limusa, México D.F. pp. 636.
18. Garay-Arroyo A., Covarrubias A.A., Clark I., Niño I., Gosset G., Martínez A. (2004) Response to different environmental stress conditions of industrial and laboratory *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Applied Microbiology and Biotechnology* 63:734-741.
19. Garhyan P., Elnashaie S.S.E.H. (2004a) Utilization of mathematical models to investigate the bifurcation and chaotic behavior of ethanol fermentors. *Mathematical and Computer Modelling* 39:381-427.
20. Garhyan P., Elnashaie S.S.E.H. (2004b) Static/Dynamic Bifurcation and Chaotic Behavior of an Ethanol Fermentor. *Industrial and Engineering Chemical Research* 43:1260-1273.
21. Garhyan P., Elnashaie S.S.E.H. (2005) Experimental Investigation and Confirmation of Static/Dynamic Bifurcation Behavior in a Continuous Ethanol Fermentor. *Practical Relevance of Bifurcation and the Contribution of Harmon Ray. Industrial and Engineering Chemical Research* 44:2525-2531.
22. Garhyan P., Elnashaie S.S.E.H., Al-Haddad S.M., Ibrahim G., Elshishini S.S. (2003) Exploration and exploitation of bifurcation/chaotic behavior of a continuous fermentor for the production of ethanol. *Chemical Engineering Science* 58:1479-1496.
23. Ghommidh C., Vaija J., Bolarinwa S., Navarro J.M. (1989) Oscillatory behaviour of *Zymomonas* in continuous cultures: A simple stochastic model *Biotechnology Letters* 11:659-664.
24. Gutiérrez L.F., Sánchez O.J., Cardona C.A. (2005) Modeling of batch extractive fermentation for the fuel ethanol production, 8th Conference on Process Integration, Modelling and Optimization for Energy Saving and Pollution Reduction, Giardini Naxos, Italy.

25. Henson M.A. (2003) Dynamic modeling and control of yeast cell populations in continuous biochemical reactors. *Computers & Chemical Engineering* 27:1185-1199.
26. Ingledew W.M. (1999) Alcohol production by *Saccharomyces cerevisiae*: a yeast primer, in: K. A. Jacques, et al. (Eds.), *The alcohol textbook*, Nottingham University Press, U.K.
27. Jarzebski A. (1992) Modelling of oscillatory behavior in continuous ethanol fermentation. *Biotechnology Letters* 14:137-142.
28. Jöbses I., Egberts G., Baalen A., Roels J. (1985) Mathematical modelling of growth and substrate conversion of *Zymomonas mobilis* at 30 and 35 °C. *Biotechnology and Bioengineering* 27:984-995.
29. Jöbses I., Egberts G., Luyben K., Roels J. (1986) Fermentation kinetics of *Zymomonas mobilis* at high ethanol concentrations: oscillations in continuous cultures. *Biotechnology and Bioengineering* 28:868 – 877.
30. Kosaric N., Vardar-Sukan F. (2001) Microbiology and Biochemistry of Ethanol Formation, in: M. Roehr (Ed.), *The biotechnology of ethanol. Classical and future applications. Part II. Potential Source of Energy and Chemical Products*, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, Germany. pp. 90-106.
31. Laopaiboon L., Nuanpeng S., Srinophakun P., Klanrit P., Laopaiboon P. (2009) Ethanol production from sweet sorghum juice using very high gravity technology: Effects of carbon and nitrogen supplementations. *Bioresource Technology* 100:4176–4182.
32. Lee J.H., Lim H.C. (1999) Multiplicity and stability analysis of continuous pre-fermentation of cheese culture. *Process Biochemistry* 34:467-475.
33. Lee K.J., Tribe D.E., Rogers P.L. (1979) Ethanol production by *Zymomonas mobilis* in continuous culture at high glucose concentration. *Biotechnology Letters* 1:421-426.
34. Lee K.J., Skotnicki M.L., Tribe D.E., Rogers P.L. (1980a) High productivity ethanol fermentations with *Zymomonas mobilis*. *Process Biochemistry* 15:7-10.
35. Lee K.J., Skotnicki M.L., Tribe D.E., Rogers P.L. (1980b) Kinetics studies on a highly productive strain of *Zymomonas mobilis*. *Biotechnology Letters* 2:339-344.

36. Lei F., Rotboll M., Jorgensen S. (2001) A biochemically structured model for *Sacchromyces cerevisiae* Journal of Biotechnology 88:205-221.
37. Lenbury Y., Neamvong A., Amornsamankul S., Puttapiban P. (1999) Modelling effects of high product and substrate inhibition on oscillatory behavior in continuous bioreactors. Biosystems 49:191-203.
38. McLellan J., Daugulis A., Li J. (1999) The incidence of oscillatory behavior in the continuous fermentation of *Zymomonas mobilis*. Biotechnology Progress 15:667-680.
39. Münch T., Sonnleitner B., Fiechter A. (1992) The decisive role of the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle behaviour for dynamic growth characterization. Journal of Biotechnology 22:329-351.
40. Namjoshi A., Kienle A., Ramkrishna D. (2003) Steady-state multiplicity in bioreactors: bifurcation analysis of cybernetic models. Chemical Engineering Science 58:793-800.
41. Namjoshi A.A., Ramkrishna D. (2001) Multiplicity and stability of steady states in continuous bioreactors: dissection of cybernetic models. Chemical Engineering Science 56:5593-5607.
42. Nielsen J., Nikolajsen K., Villadsen J. (1991a) Structured modeling of a microbial system: I. A theoretical study of the lactic acid fermentation. Biotechnology and Bioengineering 38:1-10.
43. Nielsen J., Nikolajsen K., Villadsen J. (1991b) Structured modeling of a microbial system 2. Verification of a structured lactic acid fermentation model. Biotechnology and Bioengineering 38:11-23.
44. Parulekar S.J., Semones G.B., Rolf M.J., Lievens J.C., Lim H.C. (1986) Induction and elimination of oscillations in continuous cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnology and Bioengineering 28:700-710.
45. Paz I.C., Cardona C.A. (2007) Estabilidad de biorreactores convencionales y no convencionales, III Simposio sobre biofábricas. La biotecnología como herramienta para el desarrollo y el bienestar, Medellín, Colombia.
46. Perego Jr L., Cabral de S. Dias J.M., Koshimizu L.H., de Melo Cruz M.R., Borzani W., Vairo M.L. (1985) Influence of temperature, dilution rate and sugar concentration

- on the establishment of steady - state in continuous ethanol fermentation of molasses. *Biomass* 6:247-256.
47. Pinheiro I.O., Souza M.B.D., Lopes C.E. (2004) The dynamic behaviour of aerated continuous flow stirred tank bioreactor. *Mathematical and Computer Modelling* 39:541-566.
 48. Porro D., Martegani E., Ranzi B., Alberghina L. (1988) Oscillations in continuous cultures of budding yeast: A segregated parameter analysis. *Biotechnology and Bioengineering* 32:411–417.
 49. Ramaswamy S., Cutright T.J., Qammar H. (2005) Control of a continuous bioreactor using model predictive control. *Process Biochemistry* 40:2763-2770.
 50. Ramkrishna D. (2003) On modeling of bioreactors for control. *Journal of Process Control* 13:581-589.
 51. Rozich A.F., Gaudy Jr. A.F., D'Adamo P.C. (1985) Selection of growth rate model for activated sludge treating phenol. *Water Research* 19:481-490.
 52. Strässle C., Sonnleitner B., Fiechter A. (1988) A predictive model for the spontaneous synchronization of *Saccharomyces cerevisiae* grown in continuous culture - I. Concept. *Journal of Biotechnology* 7:299-318.
 53. Strässle C., Sonnleitner B., Fiechter A. (1989) A predictive model for the spontaneous synchronization of *Saccharomyces cerevisiae* grown in continuous culture - II. Experimental verification. *Journal of Biotechnology* 9:191-208.
 54. Szederkényi G., Kristensen N.R., Hangos K.M., Bay Jorgensen S. (2002) Nonlinear analysis and control of a continuous fermentation process *Computers & Chemical Engineering* 26:659-670.
 55. Thomas K.C., Hynes S.H., Ingledew W.M. (1996) Practical and theoretical considerations in the production of high concentration of alcohol by fermentation. *Process Biochemistry* 31:321-331.
 56. Wik T., Göransson E., Breitholtz C. (2006) Low model order approximations of continuously stirred biofilm reactors with Monod kinetics *Biochemical Engineering Journal* 30:16-25.

57. Xiu Z.-L., Song B.-H., Sun L.-H., Zeeng A.-P. (2002) Theoretical analysis of effects of metabolic overflow and time delay on the performance and dynamic behavior of a two-stage fermentation process. *Biochemical Engineering Journal* 11:101–109.
58. Zhang Y., Zamamiri A., Henson M., Hjortso M. (2002) Cell population models for bifurcation analysis and nonlinear control of continuous yeast bioreactors. *Journal of Process Control* 12:721-734.
59. Zhao X.Q., Bai F.W. (2009) Mechanisms of yeast stress tolerance and its manipulation for efficient fuel ethanol production. *Journal of Biotechnology* 144:23-30.

CAPÍTULO 2

CONCEPTOS Y MÉTODOS

*“El hombre proyecta su vida,
pero el Señor dirige sus pasos.”*

Proverbios 16, 9

En este capítulo se describen los métodos implementados para el modelamiento y simulación de los sistemas estudiados. Igualmente, se resumen los conceptos básicos para la interpretación y el análisis de los resultados obtenidos.

2.1 MODELAMIENTO DE SISTEMAS BIOQUÍMICOS

El crecimiento microbiano ha sido un proceso difícil de modelar debido a las múltiples interacciones entre las células y el medio, y a la gran cantidad de reacciones bioquímicas que intervienen en la actividad celular. Varios modelos conceptuales y matemáticos se han formulado con el objeto de explicar y replicar el comportamiento que muestran los sistemas biológicos. Estos modelos se han clasificado según las consideraciones asumidas respecto a la estructura de las células o a la distribución de la población celular. La clasificación más general incluye modelos no-estructurados, estructurados y segregados.

2.1.1 Modelos No-Estructurados

Los modelos no-estructurados son los modelos más simples para escribir el crecimiento microbiano. En ellos se asume que las células son una entidad en solución, la cual interactúa con el ambiente. No se reconoce ninguna estructura interna de las células, y la diversidad de la población no se toma en cuenta. La masa celular se describe por una sola variable, la cual corresponde a la concentración de biomasa total. La expresión más utilizada es la ecuación de Monod. Esta reporta buenos resultados para un número considerable de situaciones en estado estable. Sin embargo, la expresión no ajusta los datos de todos los procesos de fermentación (Nielsen et al., 2004). Por esta razón, varios autores la han modificado para mejorar su ajuste a casos particulares. Por otro lado, la ecuación de Monod no aproxima bien cuando ocurre inhibición por sustrato y/o producto. Por esta razón, se han formulado modelos que incorporan cinéticas con inhibición por sustrato y/o producto. Se ha propuesto correlaciones tipo lineales, exponenciales, hiperbólicas y parabólicas con base en observaciones experimentales, y se han aplicado en diferentes estudios con buenos resultados (D'Adamo et al., 1984; Daugulis et al., 1997; Jöbses et al., 1986; Lenbury et al., 1994; Lenbury et al., 1999; Mulchandani and Luong, 1989; Nielsen et al., 2004; Pinheiro et al., 2004; Xiu et al., 1998). Otro modelo no-estructurado común es aquel donde se incluye el proceso de mantenimiento. Este considera dos reacciones a través de las cuales, el sustrato se consume, una donde se convierte en biomasa, y otra donde se usa para el mantenimiento de la célula independiente del proceso de crecimiento. Al igual que en los demás modelos no estructurados, la biomasa se describe por solo una variable. Este modelo imita bien los resultados de muchos procesos de fermentación (Nielsen et al., 2004).

2.1.2 Modelos Estructurados

En los modelos estructurados, se considera la estructura de la biomasa, y esta se describe con más de una variable (Lei et al., 2001). Estos modelos se pueden clasificar en modelos simples o mecanísticos.

Modelos estructurados simples. Incorporan cualitativamente algunos mecanismos básicos del comportamiento celular. Estos modelos tienen una capacidad de predicción más alta que los modelos no-estructurados. Con ellos es posible describir los procesos de crecimiento a diferentes condiciones de operación con el mismo grupo de parámetros, y se pueden aplicar para optimización de procesos. En estos modelos, los componentes de la biomasa se juntan en algunas variables clave que son representativas del comportamiento celular. La actividad microbiana es función de variables abióticas y de la composición celular. La actividad microbiana depende de las condiciones ambientales que el cultivo ha sufrido en el pasado. Los componentes incluidos en el modelo representan el agrupamiento de diferentes enzimas, metabolitos u otros componentes. Las reacciones consideradas son empíricas ya que ellas no representan conversión entre los componentes reales. Las cinéticas para las reacciones individuales usualmente se describen con expresiones empíricas tal que los datos experimentales se ajustan con pocos parámetros. Se utilizan expresiones como la de Monod ya que resume algunas características fundamentales de la mayoría de las reacciones celulares. A pesar de la naturaleza empírica de los modelos estructurados simples, estos se basan en mecanismos celulares bien establecidos, y pueden simular muy bien ciertas características de los experimentos. Hay principalmente dos clases de modelos estructurados simples, los modelos de compartimientos y los modelos cibernéticos (Nielsen et al., 2004).

En los *modelos de compartimientos*, la masa celular se divide, desde un punto de vista macroscópico, en compartimientos conformados por enzimas individuales y grupos de macromoléculas (Nielsen et al., 1991a; Nielsen et al., 1991b; Williams, 1967). Estos compartimientos se escogen de acuerdo al tamaño del denominado componente activo. El

tamaño de este compartimiento se incrementa y se puede correlacionar linealmente con la velocidad de crecimiento específico; mientras que el tamaño de otro compartimiento (inactivo) disminuye con la velocidad de crecimiento específico. En algunos casos, ambos compartimientos se ha considerado activos, y están conformados por moléculas que están involucradas en el proceso de crecimiento (Ramkrishna et al., 1967).

Los *modelos cibernéticos* fueron desarrollados por Ramkrishna y colaboradores (Namjoshi et al., 2003; Ramkrishna, 2003) con el objeto de describir el crecimiento celular en múltiples sustratos. La idea básica del modelo es que una enzima clave juega un papel “cuello de botella” en el crecimiento sobre un sustrato particular. Esta enzima se debe sintetizar antes de que ocurra el crecimiento sobre el sustrato. El esquema de reacción para el proceso de crecimiento se puede resumir en tres grupos de ecuaciones: una para formación de todos los componentes de la biomasa excepto enzimas, otro grupo para formación de cada enzima, y otra para describir su degradación. Las cinéticas se describen con expresiones como la de Monod. Para modelos cibernéticos, todos los parámetros se pueden estimar en experimentos con sustratos individuales, y se logra un buen trabajo con sustratos mixtos. Estos modelos suministran una buena estructura de modelamiento, la cual se puede usar para diseñar procesos de fermentación (Namjoshi and Ramkrishna, 2001). Sin embargo, estos modelos se han desarrollado hasta una etapa donde su complejidad y gran cantidad de parámetros obstruyen el razonamiento de los comportamientos observados.

Los *Modelos Mecanísticos* son un tipo de modelos estructurados más complejo. Se usan para estudiar por separado procesos específicos de las células. Se formulan a nivel molecular, y permiten analizar cuantitativamente interacciones entre diferentes componentes del sistema. Con estos modelos se pueden considerar características propias de las células individuales; por ejemplo, la geometría celular para inspeccionar sus efectos potenciales sobre el transporte de nutrientes. Además, estos modelos permiten considerar distribuciones espaciales de los componentes intracelulares, y dejan incluir modelos de trayectorias bioquímicas y modelos de control metabólico.

2.1.3 Modelos Segregados

Los modelos segregados tienen en cuenta que la población celular es heterogénea. Las células individuales en la población se describen por solo una variable (masa celular o edad celular). Estos modelos se aplican a sistemas microbianos en los cuáles se observa que la diferenciación de las células juega un papel importante en el desempeño global del cultivo, y que las cinéticas de crecimiento y la productividad del cultivo son afectadas por la aparición de más de un tipo de célula. Estos sistemas se caracterizan por formular una propiedad importante de las células, por ejemplo la edad celular, sobre una distribución continua. Estos modelos se han aplicado para describir el crecimiento de hongos filamentosos (Megee et al., 1970; Nielsen, 1993), y otros sistemas celulares como cultivos con bacterias que contienen plásmidos inestables (Nielsen et al., 2004). Estos modelos también se han usado para explicar por qué razón los cultivos de levaduras muestran un comportamiento oscilatorio (Cazzador, 1991; Cazzador et al., 1990; Münch et al., 1992; Zamamiri et al., 2002; Zhang and Henson, 2001; Zhang et al., 2002).

La selección de un tipo de modelo depende del objetivo del trabajo a realizar. Un factor de decisión importante es la disponibilidad de datos experimentales para las variables consideradas en el modelo. Se recomienda mantener un equilibrio entre el número de parámetros, y la correcta interpretación del comportamiento observado.

2.2 ANÁLISIS DE LA DINÁMICA DE SISTEMAS BIOQUÍMICOS

En general, un biorreactor se puede modelar con un sistema de ecuaciones diferenciales. Si se asume uniformidad (mezcla perfecta) dentro del biorreactor, solo ocurren variaciones respecto al tiempo, y el sistema se puede describir con un grupo de ecuaciones diferenciales ordinarias de primer orden, que en forma de vector se escriben de la siguiente forma:

$$\frac{dx}{dt} = f(x, t; p) \quad x \in \mathfrak{R}^n \quad p \in \mathfrak{R}^m \quad (1)$$

Donde:

x : variable,

p : parámetros del sistema,

t : tiempo.

Según el grado de no linealidad que exhiba el sistema dinámico descrito por la Ecuación 1, se observan los diferentes tipos de comportamientos que son propios de estos sistemas, tales como multiplicidad de estados estacionarios (o puntos de equilibrio), periodicidad, bifurcaciones y caos.

2.2.1 Estados Estacionarios

Los estados estacionarios se obtienen a partir del análisis del modelo del sistema, al igualar las derivadas a cero. Ya que generalmente el sistema está dado por n ecuaciones no-lineales, puede haber más de un estado estacionario para un grupo de valores de los parámetros p . El carácter de un estado estacionario x_s se determina linealizando el sistema de ecuaciones diferenciales alrededor del estado estacionario, y calculando los valores propios λ de la matriz Jacobiana resultante descrita en la Ecuación 2.

$$J(x_s) = \left[\frac{\partial f(x; p)}{\partial x} \right]_{x=x_s} \quad (2)$$

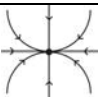
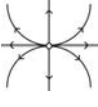
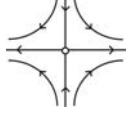


Donde:

J : Matriz jacobiana,

x_s : estado estacionario de la variable x .

En un sistema bidimensional, la estabilidad del estado estacionario se define según los criterios resumidos en la **Tabla 4**. Para sistemas de orden superior, donde más de dos valores propios están involucrados, se aplican criterios de estabilidad similares (Kuznetsov, 2004; Parker and Chua, 1989; Pavlou, 1999; Seydel, 1994).

Tabla 4. Clasificación de estados estacionarios para un sistema bidimensional.

Valores propios	Signo de la parte real	Clasificación		Descripción	Retrato de fase
Ambos son reales $\lambda_1, \lambda_2 \in \mathfrak{R}$	Ambos negativos $\lambda_1 < 0$ y $\lambda_2 < 0$	Nodo estable		Las trayectorias se dirigen hacia el punto de equilibrio	
	Ambos positivos $\lambda_1 > 0$ y $\lambda_2 > 0$	Nodo inestable		Las trayectorias se dirigen hacia fuera del punto de equilibrio	
	Signos opuestos $\lambda_1, \lambda_2 \in \mathfrak{R}$ $\lambda_1 < 0, \lambda_2 > 0$	Silla		Siempre es inestable	
Complejos conjugados con parte real diferente de cero $\lambda_{1,2} = \alpha \pm j\beta$	Ambos negativos $\alpha < 0$	Foco: Las trayectorias cercanas al punto de equilibrio parecen un	Foco estable	Las trayectorias van hacia el punto de equilibrio	
	Ambos positivos $\alpha > 0$	un Foco inestable		Las trayectorias van hacia fuera del punto de equilibrio	

α : parte real del valor propio

β : parte imaginaria del valor propio

Cuando los valores propios son complejos conjugados con parte real cero, $\lambda_{1,2} = \pm j\beta$, se tiene un ciclo límite, es decir, un estado periódico del sistema. El carácter de un ciclo límite está determinado por los multiplicadores de Floquet. Dependiendo de la naturaleza y la magnitud de estos multiplicadores, los ciclos límite también se pueden clasificar en nodos, focos o sillas. La definición de la estabilidad para un ciclo límite es análoga a la de un punto de equilibrio (Pavlou, 1999) :

- Si todas las trayectorias que comienzan cerca del ciclo límite tienden a él cuando el tiempo se incrementa, se tiene un ciclo límite estable.
- Si todas las trayectorias que comienzan cerca del ciclo límite divergen fuera de éste cuando el tiempo se incrementa, se tiene un ciclo límite inestable.

En este trabajo, el estudio de los sistemas fue delimitado sólo a la determinación y clasificación de estados estacionarios. La aparición de estados periódicos no fue analizada.

2.2.2 Bifurcaciones

Una bifurcación se define como un cambio cualitativo en el sistema. Por ejemplo, cuando un punto de equilibrio desaparece, o el estado estacionario cambia desde un equilibrio a una oscilación. Las bifurcaciones se caracterizan matemáticamente por el cambio en los valores propios del sistema cuando se varía un parámetro del sistema.

Si se considera la ecuación dinámica general:

$$\dot{x} = f(x, p) \quad (3)$$

La solución de estado estacionario (también conocida como punto de equilibrio) es:

$$0 = f(x, p) \quad (4)$$

Un punto de bifurcación ocurre donde la función y su primera derivada son cero:

$$f(x, p) = \frac{\partial f}{\partial x} = 0 \quad (5)$$

El número de soluciones de la Ecuación 4 se puede determinar a partir de la *catastrophe theory*. La Ecuación 4 tiene k soluciones, si se satisfacen los siguientes criterios (Bequette, 1998):

$$f(x, p) = 0 = \frac{\partial f}{\partial x} = \frac{\partial^2 f}{\partial x^2} = \dots = \frac{\partial^{k-1} f}{\partial x^{k-1}} = 0 \quad (6)$$

$$\frac{\partial^k f}{\partial x^k} \neq 0 \quad (7)$$

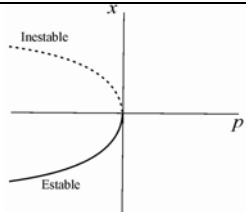
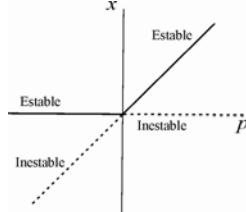
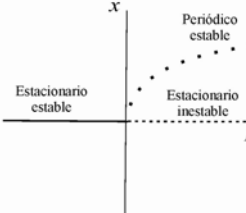

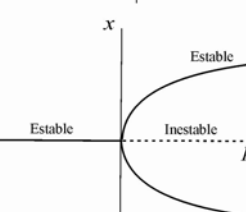
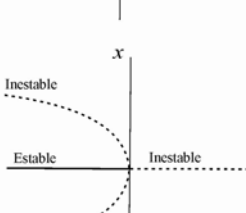
En la **Tabla 5** se resumen las bifurcaciones de estado estacionario elementales que se pueden observar cuando se varía un parámetro del sistema.

2.2.3 Caos

Para el término caos, todavía no se ha aceptado universalmente una definición, pero se está de acuerdo en que es un comportamiento aperiódico a largo plazo en un sistema determinístico que exhibe dependencia sensible de las condiciones iniciales (Strogatz, 1994).

De manera simple se ha definido como “ninguna de las anteriores”, es decir que es un comportamiento de estado estacionario limitado que no es un punto de equilibrio, ni es periodicidad (Parker and Chua, 1989). Este fenómeno resulta a partir de cambios radicales ante variaciones muy pequeñas de los parámetros (inestabilidad estructural).

Tabla 5. Bifurcaciones de estado estacionario elementales para sistemas de codimensión-1.

Comportamiento valores propios	Bifurcación	Descripción	Diagrama de bifurcación
Un valor propio real cruza el eje imaginario.	Silla – nodo (<i>Limit point</i>)	Dos estados estacionarios difiriendo en el signo de uno de sus valores propios colisiona y desaparecen.	
	Transcrítica	Dos estados estacionarios difiriendo en el signo de uno de sus valores propios colisionan y cambian su carácter.	
Un par de valores propios conjugados cruza el eje imaginario. (En sistemas de orden superior, el carácter del resto de los valores propios de los estados estacionarios no cambia).	Hopf supercrítica	En un sistema de dos dimensiones, un foco estable se convierte en un foco inestable y nace un ciclo límite estable a su alrededor.	
	Hopf subcrítica	En un sistema de dos dimensiones, un foco inestable se convierte en un foco estable y nace un ciclo límite inestable a su alrededor.	
Un punto fijo cambia su estabilidad y nacen dos nuevos puntos fijos	Pitchfork supercrítica	Una única solución real (y estable) cambia a tres soluciones reales, dos de las soluciones son estables y una es inestable.	
	Pitchfork subcrítica	Una única solución real inestable cambia a dos soluciones inestables y una estable.	

2.3 MÉTODOS Y HERRAMIENTAS

El análisis de estabilidad se aplica para determinar los estados estacionarios del sistema, clasificarlos y evaluar la dinámica local. Métodos tipo Newton o cuasi-Newton, de continuación, o de optimización global se deben implementar con el fin de determinar las soluciones de estado estable. Mediante el análisis de bifurcación se estudia el cambio en las propiedades cualitativas del sistema cuando se varía un parámetro de interés (Abashar, 2004; Berezowski, 2000; Cardona et al., 2003; Garhyan and Elnashaie, 2004a; Garhyan and Elnashaie, 2004b; Garhyan et al., 2003; Zhang and Henson, 2001; Zhang et al., 2002). Las posibilidades de cambio se visualizan en diagramas de bifurcación, donde se grafica una variable de salida del sistema en función del parámetro de operación analizado (parámetro de bifurcación).

La simulación dinámica se aplica para determinar el comportamiento de las variables de salida en el tiempo, para estimar el comportamiento general (no local) del sistema, y tener una aproximación sobre transiciones de estado a estado. Con el fin de visualizar los resultados, se construyen planos de fase. Esos planos se obtienen resolviendo el modelo en el tiempo para diferentes condiciones iniciales, y graficando en un plano bidimensional el valor respectivo para dos variables de salida en cada instante de tiempo.

2.3.1 Método Desarrollado para Determinar los Estados Estacionarios del Sistema y Construir Diagramas de Bifurcación

Con la colaboración del Grupo de Ingeniería de Procesos y Sistemas de la Planta Piloto de Ingeniería Química (Universidad Nacional del Sur) de la ciudad de Bahía Blanca en Argentina, fue implementado para este trabajo, un método de optimización global (Floudas, 1999) para determinar los estados estacionarios del sistema. El método desarrollado garantiza que todos los estados estacionarios se determinan sin depender de un estimado inicial.

El cálculo de los estados estacionarios se expresa como un problema P1 que abarca todas las soluciones del grupo de ecuaciones diferenciales no lineales que integran el modelo. Este problema está sujeto a restricciones de desigualdad y de límite de las variables. En general, el problema se formula como:

P1. (8)

$$h_j(X) = 0, \quad j \in N_E$$

$$g_k(X) \leq 0, \quad k \in N_I$$

$$X^L \leq X \leq X^U$$

Donde $h_j(X)$ son las funciones no lineales, $g_k(X)$ son las funciones de desigualdad, N_E es el grupo de desigualdades, N_I es el grupo de restricciones de desigualdad, X es el vector de variables, y X^L , X^U son los límites inferior y superior de las variables x_i .

Con el objeto de resolver el Problema P1 (Ecuación 8), se implementó la metodología propuesta por Floudas (Floudas, 1999; Maranas and Floudas, 1995). El Problema P1 se transforma en el Problema de optimización global P2 (Ecuación 9) introduciendo la variable de holgura s .

P2. (9)

$$\min_{X, s \geq 0} s$$

Sujeto a

$$h_j(X) - s \leq 0, \quad j \in N_E$$

$$-h_j(X) + s \leq 0, \quad j \in N_E$$

$$g_k(X) \leq 0, \quad k \in N_I$$

$$X^L \leq X \leq X^U$$

$$s \geq 0$$

Hay correspondencia una a una entre las soluciones globales múltiples de P2 ($x_1^*, x_2^*, \dots, x_n^*, s^*$) para las cuales $s^* = 0$, y las soluciones de P1. Ninguna solución existe si el mínimo global de P2, s^* , involucra un valor diferente de cero (Maranas and Floudas, 1995). Ya que $h_f(X)$ es no-lineal, P2 es un problema de optimización no-convexo.

Para encontrar una solución alternativa, en cada iteración se incorporan restricciones, como la Ecuación 10, al problema de optimización P2 (Ecuación 9)

$$(x - x^p)^2 \geq \varepsilon, \quad \varepsilon > 0 \quad (10)$$

Se puede obtener una solución alternativa óptima con valor objetivo $s \leq \varepsilon$, o una solución posible con $s > \varepsilon$.

Si $s \leq \varepsilon$, luego $p = p + 1$, $(x_1^p, x_2^p, \dots, x_n^p) = (x_1, x_2, \dots, x_n)$ y el problema se resuelve de nuevo.

Si $p = 0$, no hay solución disponible para el problema. Luego, la lista de soluciones alternativas óptimas es $(x_1^u, x_2^u, \dots, x_n^u)$, $u = 1, 2, \dots, p$.

Las Ecuaciones 9 a 10 se resuelven usando el *General Algebraic Modeling System* (GAMS). Este software es un sistema de modelamiento de alto nivel para programación matemática y optimización, el cual consiste de un lenguaje compilador, y de *solvers* de alto desempeño integrados. El problema se resuelve con BARON, el cual es uno de los *solvers* integrados en el GAMS para resolver problemas de programación no lineal (NLP), que implementa algoritmos de optimización global basados sobre estrategias de convexificación y “*branch and bound*” (Bandoni and Blanco, 2005).

Adicionalmente, se implementó una interfase entre GAMS y Matlab (Ferris, 2005) para capturar y graficar los resultados obtenidos. Mediante un algoritmo programado en Matlab, los estados estacionarios se clasifican de acuerdo a los valores propios de la matriz

jacobiana evaluada en cada punto de equilibrio (Pavlou, 1999). Los diagramas de bifurcación fueron graficados para los diferentes parámetros de interés.

2.3.2 Simulación con *Aspen Costum Modeler*

El modulo Aspen Costum Modeler (ACM) del software de simulación Aspen Tech se implementó para evaluar la respuesta dinámica de los sistemas, en tiempo real, ante cambios en los parámetros durante el transcurso de la operación. El ACM es una herramienta desarrollada por la firma Aspen Tech para crear, editar y reutilizar modelos de unidades de proceso. El ACM también permite desarrollar simulaciones en estado estable y dinámico, y exportar modelos o diagramas de flujo a otros módulos del software, tales como Aspen Plus y Aspen Dynamics. Con la implementación del ACM en este trabajo, se abrió la posibilidad de simular biorreactores en Aspen Plus, con modelos cinéticos simples y complejos que no se encuentran disponibles en las bases de datos del simulador. De esta manera, es posible potencializar las herramientas y beneficios que ofrece el software Aspen Tech, el cual está diseñado especialmente para sistemas químicos y petroquímicos, para realizar evaluaciones económicas, desarrollar análisis de sensibilidad paramétricos, y para formular estrategias de control, y de optimización en plantas de procesos biotecnológicos.

2.3.3 Otras Herramientas Utilizadas

Matlab. La simulación dinámica de los sistemas se llevó a cabo en Matlab, utilizando el solver Ode23s para la solución de las ecuaciones diferenciales, y para la posterior construcción de diagramas de fase.

Algoritmo de Reducción de Residuos (WAR). El algoritmo de reducción de residuos (WAR) desarrollado por la Agencia de Protección Ambiental (EPA) de Estados Unidos fue utilizado para determinar un criterio que definiera la viabilidad ambiental de los bioprocesos analizados (Cardona et al., 2006).

El algoritmo introduce el concepto de un balance de impacto ambiental potencial (PEI), en el cual se asignan valores de impacto ambiental a diferentes materiales contaminantes (Cabezas et al., 1999). El impacto ambiental potencial de una cantidad de material o energía se puede definir como el efecto que este material o energía tendrían sobre el ambiente si ellos fueran emitidos al ambiente. El PEI es una cantidad conceptual que no se puede medir directamente, sin embargo se puede estimar a partir de cantidades medibles o estimables. Estos índices se evalúan sobre una base de velocidad (PEI/h), ó sobre una base de producción (PEI/kg producto). El algoritmo WAR usa ocho categorías de impacto ambiental en su evaluación (Young et al., 2000): potencial de toxicidad humano por ingestión (HTPI), potencial de toxicidad humano por exposición dérmica y por inhalación (HTPE), potencial de toxicidad terrestre (TTP), potencial de toxicidad acuático (ATP), potencial de calentamiento global (GWP), potencial de reducción del ozono (ODP), potencial de oxidación fotoquímica (PCOP), y potencial de acidificación (AP). A partir del balance de PEI, se calculan los índices de impacto ambiental de salida ($i_{out}^{(r)}$) y de generación ($i_{gen}^{(r)}$), los cuales suministran un indicativo relativo de la amigabilidad del proceso (Hilaly and Sikdar, 1995)

En necesario aclarar que el algoritmo WAR no es una herramienta de análisis del ciclo de vida (LCA). Solo considera lo relacionado a la manufactura del producto, no tiene en cuenta las otras etapas del ciclo de vida: adquisición de materias primas, distribución, uso, disposición y reciclaje del producto (Young and Cabezas, 1999).

Super Pro Designer. El *Super Pro Designer* es un software, utilizado hoy en día, para diseño en estado estable, dimensionamiento básico de equipos, simulación y evaluación económica, entre otras aplicaciones, de procesos químicos, bioquímicos y ambientales. Este software fue utilizado para llevar a cabo el diseño del biorreactor, para los sistemas analizados, por el método convencional.

REFERENCIAS

1. Abashar M.E.E. (2004) Dynamic behavior of two-phase systems in physical equilibrium. *Chemical Engineering Journal* 97:183-194.
2. Bandoni J.A., Blanco A., M. (2005) *Modelado y Optimización con GAMS*, Bahía Blanca, Argentina.
3. Bequette B.W. (1998) *Process dynamics: modeling, analysis and simulation* Prentice-Hall, New Yersey.
4. Berezowski M. (2000) Method of determination of steady - state diagrams of chemical reactors. *Chemical Engineering Science* 55:4291-4295.
5. Cabezas H., Bare J.C., Mallick S.K. (1999) Pollution prevention with chemical process simulators: the generalizad waste (WAR) algorithm – full version. *Computers and Chemical Engineering* 23:623-634.
6. Cardona C.A., Matalla L.G., Gómez A. (2003) Steady-state multiplicities in the reactive distillation process for DIPE production, 4th European Congress of Chemical Engineering, Granada, España.
7. Cardona C.A., Montoya M.I., Quintero J.A. (2006) Aplicación de algoritmos de reducción de residuos en el diseño de procesos químicos y biotecnológicos II Congreso Internacional en Diseño de Procesos Químicos y Biotecnológicos, Medellín, Colombia.
8. Cazzador L. (1991) Analysis of oscillations in yeast continuous cultures by a new simplified model. *Bull. Math. Biol.* 5:685–700.

9. Cazzador L., Mariani L., Martegani E., Alberghina L. (1990) Structured segregated models and analysis of self-oscillating yeast continuous culture. *Bioprocess Eng.* 5:175–180.
10. D'Adamo P.D., Rozich A.F., Gaudy Jr. A.F. (1984) Analysis of growth data with inhibitory carbon sources. *Biotechnology and Bioengineering* 26:397-402.
11. Daugulis A., McLellan P., Li J. (1997) Experimental investigation and modeling of oscillatory behavior in the continuous culture of *Zymomonas mobilis* *Biotechnology and Bioengineering* 56:99-105.
12. Ferris M.C. (2005) Matlab and GAMS: interfacing optimization and visualization software, Air Force Office of Scientific Research Grant F49620-98-1-0417, the National Science Foundation Grant CCR-9619765 and GAMS Corporation. pp. 20.
13. Floudas C.A. (1999) *Deterministic global optimization: Theory, methods and applications* Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
14. Garhyan P., Elnashaie S.S.E.H. (2004a) Static/Dynamic Bifurcation and Chaotic Behavior of an Ethanol Fermentor. *Industrial and Engineering Chemical Research* 43:1260-1273.
15. Garhyan P., Elnashaie S.S.E.H. (2004b) Utilization of mathematical models to investigate the bifurcation and chaotic behavior of ethanol fermentors. *Mathematical and Computer Modelling* 39:381-427.
16. Garhyan P., Elnashaie S.S.E.H., Al-Haddad S.M., Ibrahim G., Elshishini S.S. (2003) Exploration and exploitation of bifurcation/chaotic behavior of a continuous fermentor for the production of ethanol. *Chemical Engineering Science* 58:1479-1496.
17. Hilaly A.K., Sikdar S.K. (1995) Pollution balance method and the demonstration of its application to minimizing waste in a biochemical process. *Industrial and Engineering Chemical Research* 34:2051–2059.
18. Jöbses I., Egberts G., Luyben K., Roels J. (1986) Fermentation kinetics of *Zymomonas mobilis* at high ethanol concentrations: oscillations in continuous cultures. *Biotechnology and Bioengineering* 28:868 – 877.

19. Kuznetsov Y.A. (2004) Elements of applied bifurcation theory. 3th ed. Springer Verlag, N.Y.
20. Lei F., Rotboll M., Jorgensen S. (2001) A biochemically structured model for *Sacchromyces cerevisiae* Journal of Biotechnology 88:205-221.
21. Lenbury Y., Novaprteep B., Wiwatpataphee B. (1994) Dynamic behavior classification of a model for a continuous bio-reactor subject to product inhibition. Mathematical and Computer Modelling 19:107-117.
22. Lenbury Y., Neamvong A., Amornsamankul S., Puttapiban P. (1999) Modelling effects of high product and substrate inhibition on oscillatory behavior in continuous bioreactors. Biosystems 49:191-203.
23. Maranas C.D., Floudas C.A. (1995) Finding all solutions of nonlinearly constrained systems of equations. J. Global Optim. 7:143-182.
24. Megee R.D., Kinishita S., Fredrickson A.G., Tsuchiya H.M. (1970) Differentiation and product formation in molds. Biotechnology and Bioengineering 12:771–801.
25. Mulchandani A., Luong J.H.T. (1989) Microbial inhibitory kinetics revisited. Enzyme Microb. Technol. 11:66-73.
26. Münch T., Sonnleitner B., Fiechter A. (1992) The decisive role of the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle behaviour for dynamic growth characterization. Journal of Biotechnology 22:329-351.
27. Namjoshi A., Kienle A., Ramkrishna D. (2003) Steady-state multiplicity in bioreactors: bifurcation analysis of cybernetic models. Chemical Engineering Science 58:793-800.
28. Namjoshi A.A., Ramkrishna D. (2001) Multiplicity and stability of steady states in continuous bioreactors: dissection of cybernetic models. Chemical Engineering Science 56:5593-5607.
29. Nielsen J. (1993) A simple morphologically structured model describing the growth of filamentous microorganisms. Biotechnology and Bioengineering 41:715-727.
30. Nielsen J., Nikolajsen K., Villadsen J. (1991a) Structured modeling of a microbial system 2. Verification of a structured lactic acid fermentation model. Biotechnology and Bioengineering 38:11-23.

31. Nielsen J., Nikolajsen K., Villadsen J. (1991b) Structured modeling of a microbial system: I. A theoretical study of the lactic acid fermentation. *Biotechnology and Bioengineering* 38:1-10.
32. Nielsen J., Villadsen J., Lidén G. (2004) *Bioreaction Engineering Principles*. 2nd ed. Kluwer Academic, China.
33. Parker T.H., Chua L.O. (1989) *Practical numerical algorithms for chaotic systems* Springer Verlag, N.Y.
34. Pavlou S. (1999) Computing operating diagrams of bioreactors *Journal of Biotechnology* 71:7-16.
35. Pinheiro I.O., Souza M.B.D., Lopes C.E. (2004) The dynamic behaviour of aerated continuous flow stirred tank bioreactor. *Mathematical and Computer Modelling* 39:541-566.
36. Ramkrishna D. (2003) On modeling of bioreactors for control. *Journal of Process Control* 13:581-589.
37. Ramkrishna D., Fredrickson A.G., Tsuchiya H.M. (1967) Dynamics of microbial propagation: Models considering inhibitors and variable cell composition. *Biotechnology and Bioengineering* 9:129–170.
38. Seydel R. (1994) *Practical bifurcation and stability analysis - From equilibrium to chaos*. 2nd ed. Springer Verlag, N.Y.
39. Strogatz S.H. (1994) *Nonlinear Dynamics and Chaos: with applications to physics, biology, chemistry and engineering* Addison - Wesley, Estados Unidos.
40. Williams F.M. (1967) A model of cell growth dynamics. *J. Theor. Biol.* 15:190–207.
41. Xiu Z.L., Zeng A.P., Deckwer W.D. (1998) Multiplicity and stability analysis of microorganisms in continuous culture: effects of metabolic overflow and growth inhibition. *Biotechnology and Bioengineering* 57:251–261.
42. Young D., Cabezas H. (1999) Designing sustainable processes with simulations: The waste reduction (WAR) algorithm. *Computers and Chemical Engineering* 23:1477-1491.

43. Young D., Scharp R., Cabezas H. (2000) The waste reduction (WAR) algorithm: environmental impacts, energy consumption, and engineering economics. *Waste Management* 20:605-615.
44. Zamamiri A., Zhang Y., Henson M., Hjortso M. (2002) Dynamic analysis of an age distribution model of oscillating yeast cultures. *Chemical Engineering Science* 57:2169–2181.
45. Zhang Y., Henson M.A. (2001) Bifurcation analysis of continuous biochemical reactor models. *Biotechnology Progress* 17:647-660.
46. Zhang Y., Zamamiri A., Henson M., Hjortso M. (2002) Cell population models for bifurcation analysis and nonlinear control of continuous yeast bioreactors. *Journal of Process Control* 12:721-734.

CAPITULO 3

ESTUDIO DE ESTABILIDAD

“Desde la Cruz se contempla mejor el Cielo.”

Madre Adela Galindo

En este capítulo se desarrolla el análisis de estabilidad para el proceso de producción de alcohol por fermentación con la bacteria *Zymomonas mobilis*, y la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Para cada sistema particular se estableció un modelo teórico que determina la relación entre el comportamiento dinámico del biorreactor en función de los parámetros de interés. Mediante el análisis de estabilidad se analiza el efecto de algunos parámetros de operación sobre la respuesta del sistema con el fin de establecer condiciones de operación que garanticen el buen desempeño del proceso.

Se analiza el efecto de la velocidad de dilución y la concentración de sustrato en la alimentación sobre la estabilidad de ambos sistemas. También, se analiza el efecto de la velocidad de flujo volumétrico de gas, la velocidad de agitación, el pH y la temperatura sobre la transferencia de masa en un sistema anaeróbico con agitación, con el fin de evaluar el comportamiento del fenómeno de desorción de CO₂ en la fermentación con *Saccharomyces cerevisiae*. Adicionalmente se evalúa la respuesta de uno de los sistemas analizados, ante cambios en los parámetros durante la operación con el modulo de modelamiento y situación *Aspen Custom Modeler*.

3.1 CASO DE ESTUDIO I. PRODUCCIÓN DE ETANOL CON *ZYMOMONAS MOBILIS*

3.1.1 Modelo Matemático

Se analiza la producción de etanol por fermentación continua con *Zymomonas mobilis* en un biorreactor de tanque agitado. El comportamiento dinámico del sistema se evaluó utilizando un modelo tipo estructurado – no-segregado que describe el comportamiento oscilatorio de cultivos continuos de este microorganismo (Garhyan and Elnashaie, 2004; Jöbses et al., 1986). La formulación de este modelo se basa en la inhibición de un componente clave denominado “*e*”, el cual, se asume, que está directamente relacionado con la producción de etanol. Las Ecuaciones 11 a 19 comprenden las expresiones matemáticas, y en la **Tabla 6** se resume el valor de los parámetros. Para este sistema se analiza el efecto de dos parámetros, la velocidad de dilución y la concentración de sustrato en la alimentación, sobre su estabilidad.

$$\frac{dC_s}{dt} = D(C_{s_f} - C_s) - R_s \quad (11)$$

$$\frac{dC_p}{dt} = D(C_{p_f} - C_p) + R_p \quad (12)$$

$$\frac{dC_x}{dt} = D(C_{x_f} - C_x) + R_x \quad (13)$$

$$\frac{dC_e}{dt} = D(C_{e_f} - C_e) + R_e \quad (14)$$

$$Rs = \left(\frac{I}{Y_{sx}} \mu + m_s \right) Cx \quad (15)$$

$$Rp = \left(\frac{I}{Y_{px}} \mu + m_p \right) Cx \quad (16)$$

$$Rx = \mu Cx \quad (17)$$

$$Re = (K_1 - K_2 Cp + K_3 Cp^2) \mu Cx \quad (18)$$

$$\mu = \mu_{max} \frac{Cs}{K_s + Cs} \frac{Ce}{Cx} \quad (19)$$

Donde Cs es la concentración de sustrato en g/L, Cs_f es la concentración de sustrato en la alimentación en g/L, Cx es la concentración de biomasa en g/L, Cx_f es la concentración de biomasa en la alimentación en g/L, Cp es la concentración de producto en g/L, Cp_f es la concentración de biomasa en la alimentación en g/L, Ce es la concentración del componente clave e en g/L, Ce_f es la concentración del componente clave e en la alimentación en g/L, D es la velocidad de dilución en h^{-1} , Rs es la velocidad de consumo de sustrato en g/L h, Rx es la velocidad de producción de biomasa en g/L h, Rp es la velocidad de generación de producto en g/L h, Re es velocidad de formación del componente clave e en g/L h, μ es la velocidad específica de crecimiento en h^{-1} , μ_{max} es la velocidad específica de crecimiento máxima en h^{-1} , Y_{sx} es el factor de rendimiento de biomasa sobre sustrato en g/g, Y_{px} es el factor de rendimiento de biomasa sobre producto en g/g, m_s es el factor de mantenimiento basado en requerimiento de sustrato en g/g h, m_p es el factor de mantenimiento basado en la formación de producto en g/g h, K_1 es una constante empírica en h^{-1} , K_2 es una constante empírica en L/ g h, K_3 es una constante empírica en L^2/g^2 h, K_s es la constante de Monod en g/L, t es el tiempo en h, X es la conversión de sustrato en

$g_{\text{sustrato convertido}}/g_{\text{sustrato alimentado}}$, Y_p es el rendimiento de producto en $g_{\text{producto}}/g_{\text{sustrato alimentado}}$, y P_p es la productividad en $g_{\text{producto}}/L \text{ h}$.

Tabla 6. Constantes para el modelo de fermentación con *Zymomonas mobilis*.

Parámetro	Valor	Unidades	Parámetro	Valor	Unidades
C_{x_f}	0	g/L	m_s	2.16	g/g h
C_{p_f}	0	g/L	m_p	1.1	g/g h
C_{e_f}	0	g/L	K_1	16	h^{-1}
μ_{max}	1	h^{-1}	K_2	4.97×10^{-1}	L/g h
Y_{sx}	2.44498×10^{-2}	g/g	K_3	3.83×10^{-3}	$L^2/g^2 h$
Y_{px}	5.26315×10^{-2}	g/g	K_s	0.5	g/L

3.1.2 Efecto de la Velocidad de Dilución

La **Figuras 1 y 2** muestran los diagrama de bifurcación calculados para las concentraciones de sustrato, producto y células viables, así como para la productividad, en función de la velocidad de dilución, para una concentración de sustrato en la alimentación de 80 y 160 g/L, respectivamente.

Para $C_{s_f} = 80 \text{ g/L}$, y un rango de D entre 0 y 0.3 h^{-1} , se observan sólo dos ramas de estados estacionarios (EE). Una de ellas se compone de estados estables, y la otra consta de estados inestables. Los EE inestables corresponden a las condiciones de *Washout* (lavado de las células); razón por la cual no hay formación de biomasa ni de producto, y la concentración de sustrato en la salida es igual a la de entrada. En la rama de EE estables, a medida que la velocidad de dilución se incrementa, la concentración de células aumenta, y la concentración de producto tiende a disminuir. Si embargo, a partir de velocidades de dilución mayores a 0.2 h^{-1} , no hay variación significativa en la concentración de producto. Pese a lo anterior, la productividad sí se incrementa, debido a que es proporcional a la velocidad de dilución ($P_p = D * C_p$).

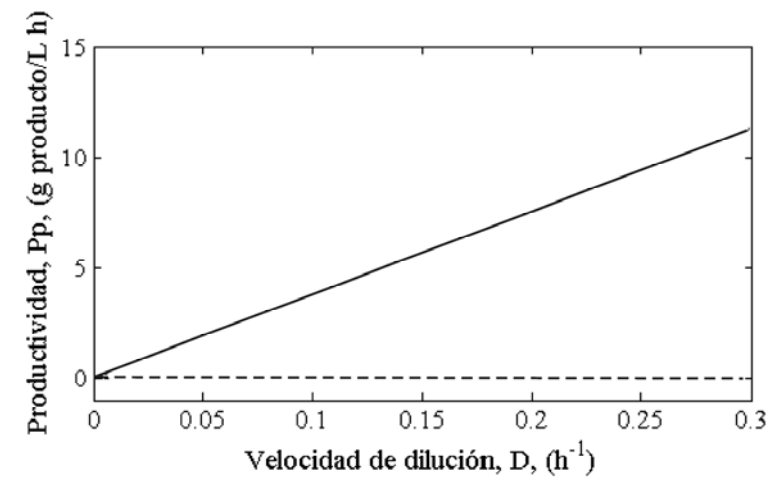
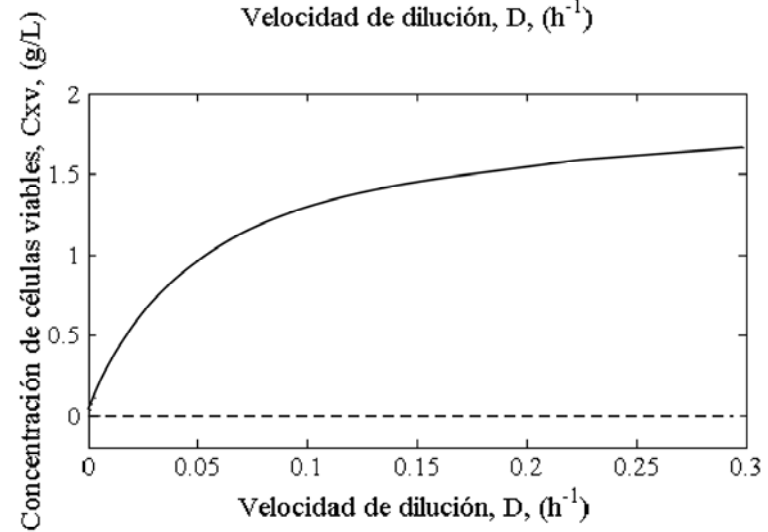
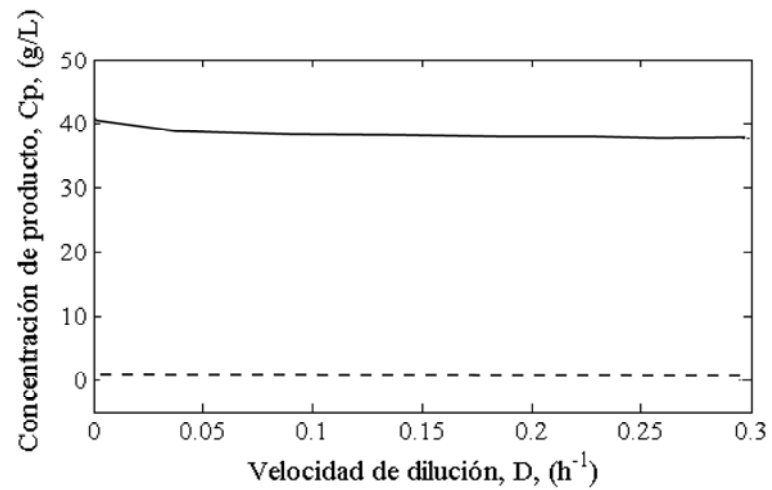
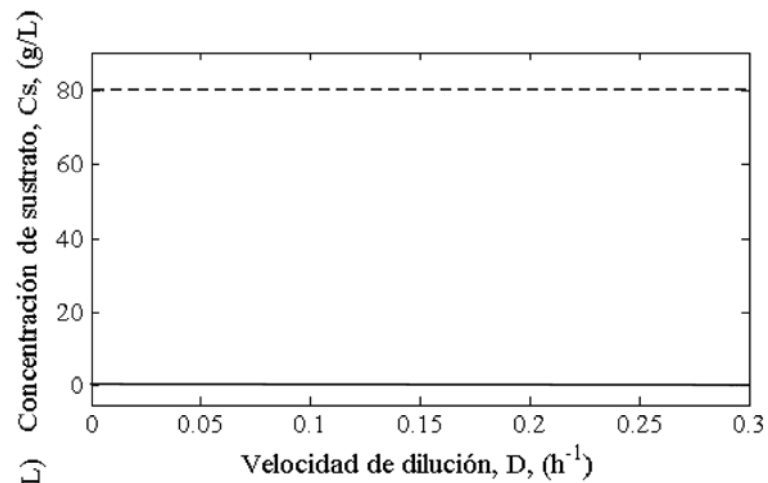


Figura 1. Diagrama de bifurcación para sistema de producción de etanol con *Zymomonas mobilis*. $C_{s_f} = 80$ g/L.
(----- EE inestable, — EE nodo estable)

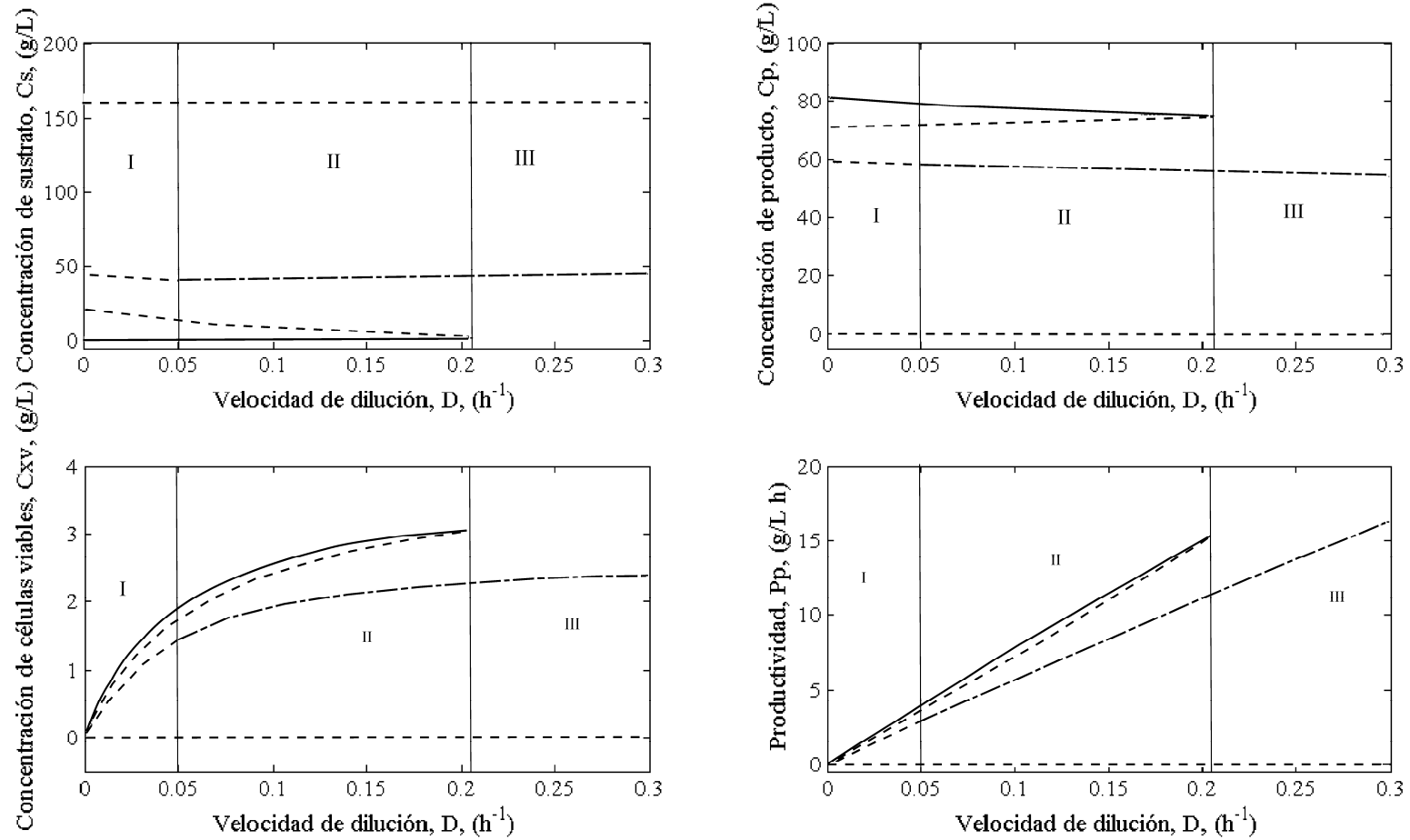


Figura 2. Diagrama de bifurcación para sistema de producción de etanol con *Zymomonas mobilis*. $C_{sf} = 160 \text{ g/L}$.

(----- EE inestable, — EE nodo estable, — — — EE foco estable)

Para $C_{sf} = 160$ g/L, dentro de todo el rango de velocidades de dilución analizado, se observan tres regiones de estabilidad. En la Región I ($0 - 0.05$ h⁻¹), se presentan 4 ramas de estados estacionarios, de las cuales tres son inestables, y una es estable. La Región II ($0.05 - 0.206$ h⁻¹) se caracteriza por tener dos ramas de estados inestables y dos ramas de estados estables, de las cuales, una tiene la característica de nodo, y la otra de foco. En la Región III ($0.206 - 0.3$ h⁻¹), se presentan dos ramas de estados estacionarios; una de ellas está compuesta por EE estables tipo foco, y la otra está constituida por EE inestables.

Dentro de la Región I se puede obtener la concentración de producto más alta, sin embargo, la productividad es muy baja. Si se opera dentro de la Región II, a unas condiciones propicias para alcanzar la rama de nodos estables, se pueden lograr una alta concentración de producto, y una buena productividad. Por otro lado, también se puede alcanzar la rama de los focos estables, aunque la concentración de producto a la que se llega en el biorreactor, bajo estas condiciones, es menor a la obtenida en la rama de nodos estables. En la Región III, la concentración de producto respectiva para la rama de focos estables es cercana a la obtenida, para la misma rama de estados estacionarios, en la Región II.

Los diagramas de bifurcación presentados en las **Figuras 1 y 2**, indican que dependiendo de la concentración de sustrato en la alimentación, el sistema presenta diferente complejidad para un mismo rango de velocidades de dilución. Se presentan regiones con 2 a 4 estados estacionarios, debido a las bifurcaciones tipo nodo-silla y tipo Hopf que sufren los estados estacionarios de las variables de salida del sistema. Por lo tanto, la selección de una adecuada velocidad de dilución para el proceso está sujeta a la concentración de sustrato alimentado con la cual se decida operar el sistema. Es importante considerar que no se debe operar a condiciones cercanas a los puntos de bifurcación debido a la facilidad con que se presentan, en las grandes plantas de producción, pequeñas variaciones en los parámetros del proceso, algunas veces imperceptible o de lenta respuesta a los sistemas de control, que pueden generar un alto impacto adverso sobre las variables de salida.

3.1.3 Efecto de la Concentración de Sustrato en la Alimentación

La **Figuras 3 y 4** muestran los diagramas de bifurcación calculados para las concentraciones de sustrato, producto y células viables, así como para la productividad, en función de la concentración de sustrato en la alimentación, para una velocidad de dilución de 0.1 y 0.25 g/L, respectivamente.

Para $D = 0.1 \text{ h}^{-1}$, y un intervalo de C_{sf} entre 60 y 160 g/L, se presentan 3 regiones de estabilidad. En la Región I (60 - 120 g/L), el sistema presenta dos ramas de EE; una de ellas es inestable (*washout*), y la otra corresponde a EE tipo nodo estable. En la Región II (120 - 154 g/L), también se presentan dos ramas de EE, con la diferencia, que la rama de nodos estables de la Región I sufre una bifurcación y pasa a ser una rama de focos estables. Estas predicciones están acorde con los resultados experimentales obtenidos por Bruce (Bruce et al., 1991), quien desarrolló una fermentación en quemostato a $D = 0,11 \text{ h}^{-1}$ y $C_{sf} = 134 \text{ g/L}$, obteniendo oscilaciones de la concentración de producto entre 30 y 50 g/L.

En la Región III (154 – 160 g/L), cuatro ramas de estados estacionarios se pueden lograr, dos de ellas son inestables, y las otras dos son estables. Una de las ramas estables está conformada por EE tipo nodo, y la otra está compuesta de EE tipo foco. Según el diagrama de bifurcación, una elevada concentración de producto se puede obtener cuando se opera a C_{sf} mayor a 154 g/L. Para C_{sf} menores a este valor, y una velocidad de dilución de 0.1 h^{-1} , la máxima concentración de producto que se puede alcanzar es 56.8 g/L. Esta concentración de producto es constante para un rango de C_{sf} entre 120 y 160 g/L, sin embargo, la concentración de sustrato residual se incrementa significativamente.

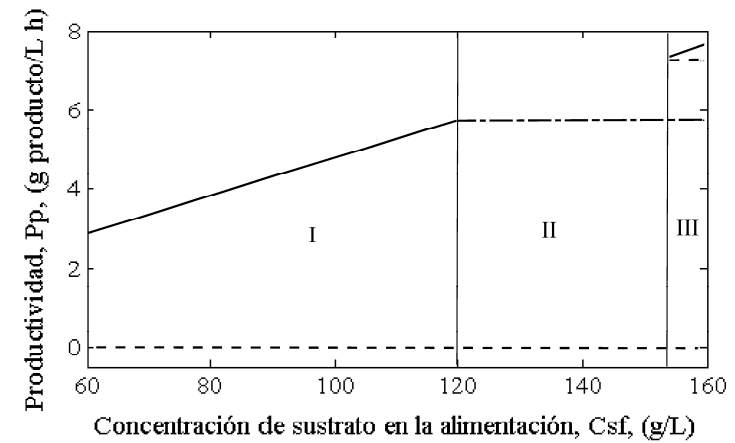
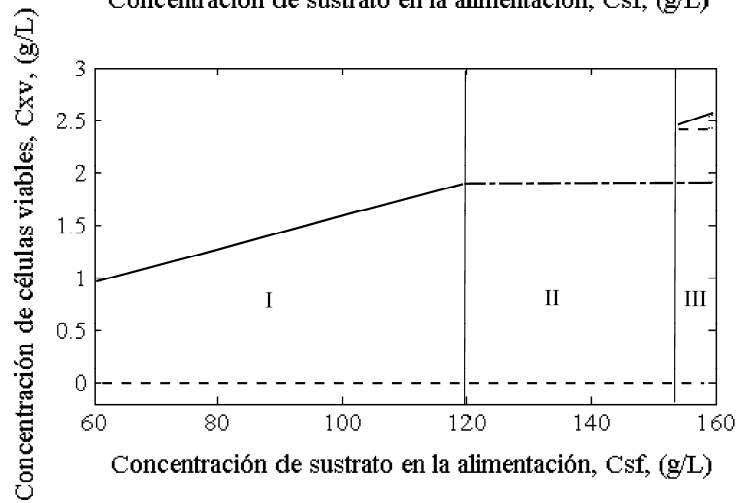
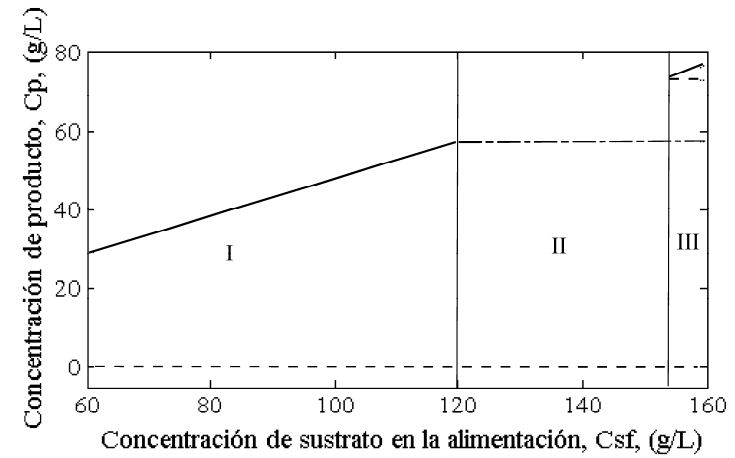
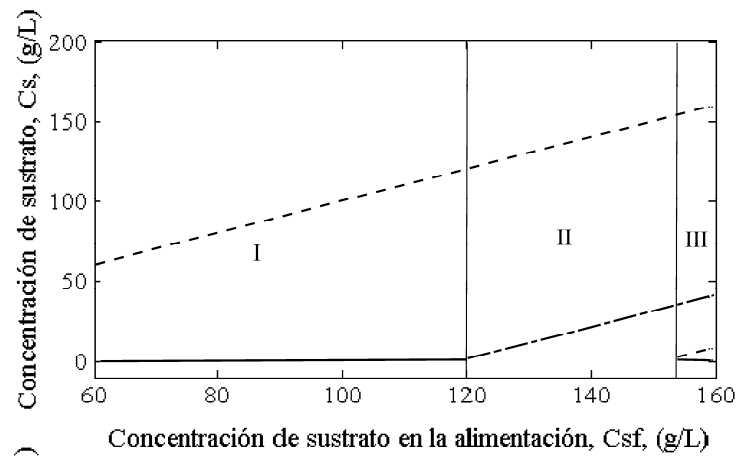


Figura 3. Diagrama de bifurcación para sistema de producción de etanol con *Zymomonas mobilis*. $D = 0.1 \text{ h}^{-1}$.

(----- EE inestable, — EE nodo estable, — — — EE foco estable)

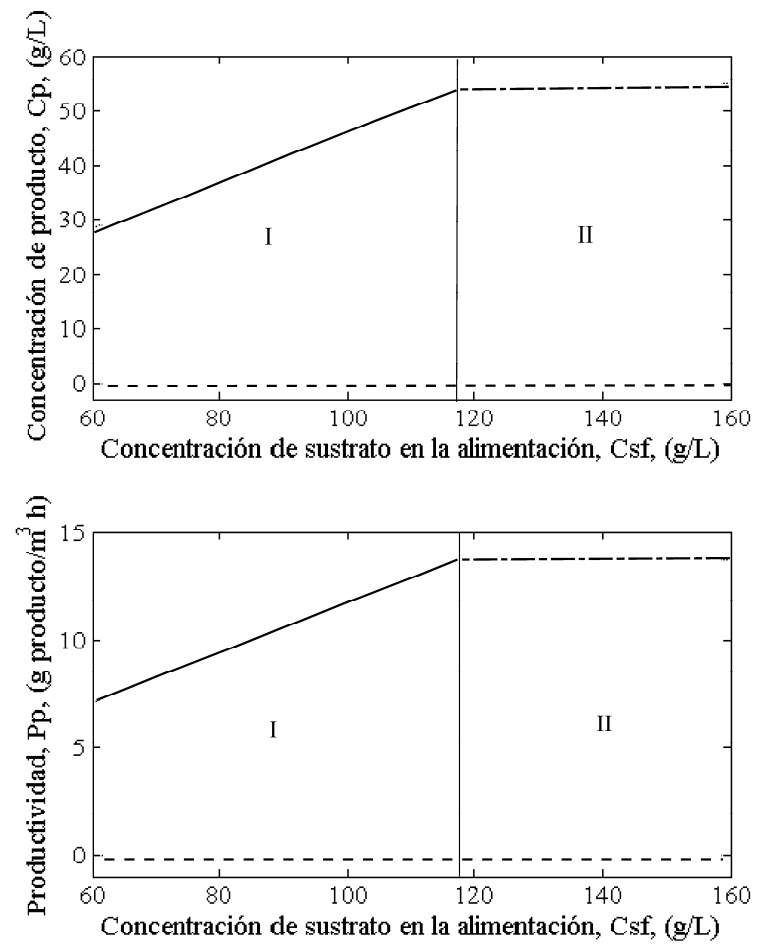
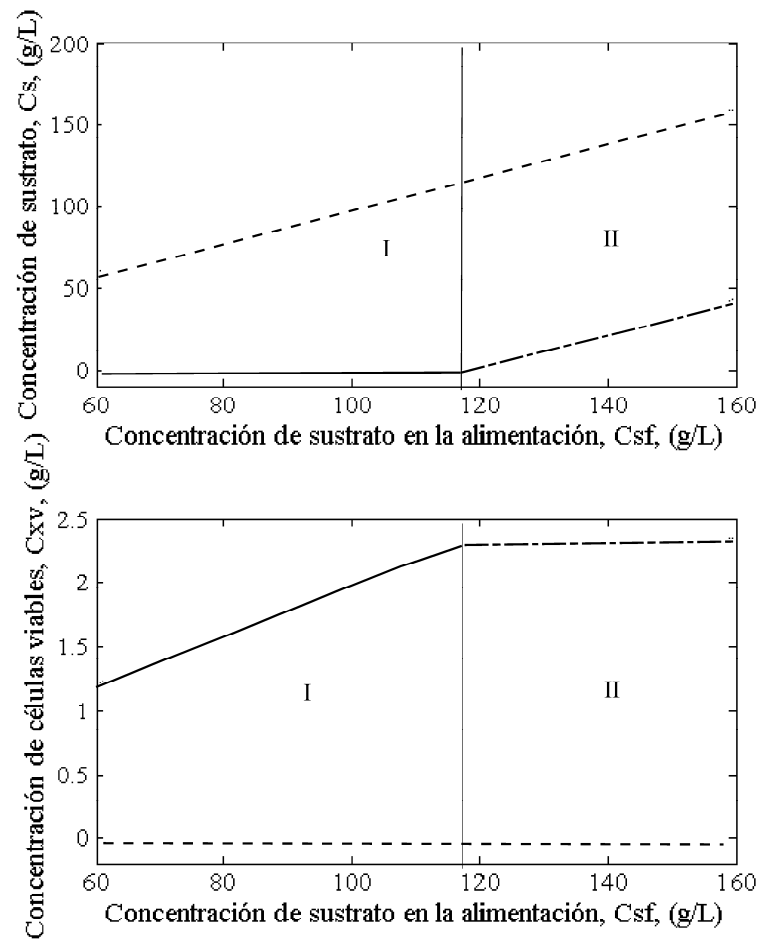


Figura 4. Diagrama de bifurcación para sistema de producción de etanol con *Zymomonas mobilis*. $D = 0.25 \text{ h}^{-1}$.

(----- EE inestable, — EE nodo estable, --- EE foco estable)

Para $D = 0.25 \text{ h}^{-1}$, y el intervalo de C_{sf} analizado, se presentan 2 regiones de estabilidad. La Región I (60 – 117.5 g/L) presenta dos ramas de estados estacionarios, una de ellas es inestable, y la otra está compuesta de EE tipo nodo estable. Esta rama de EE estable bifurca en una rama de focos estables, dando lugar a la Región II (117.5 - 160 g/L). Para este intervalo de la concentración de sustrato alimentado, la máxima concentración de producto que se logra es 54.6 g/L, la cual es constante para todo el rango; sin embargo, la conversión de sustrato disminuye con el incremento de C_{sf} .

La **Tabla 7** resume la productividad, la conversión de sustrato y el rendimiento de producto que se obtienen a ciertas condiciones de operación seleccionadas para el sistema analizado. Las condiciones correspondientes a $C_{sf} = 160 \text{ g/L}$ y $D = 0.15 \text{ h}^{-1}$, se seleccionan como una de las mas apropiadas para operar el proceso. Esto se debe a que con ellas se obtiene un estado estacionario tipo nodo estable, lo cual, si se considera la respuesta lenta de muchas de las variables de una fermentación, agiliza la estabilización del sistema y se facilita el control del proceso. Además que se logra para el proceso global una alta productividad debido a la alta concentración de producto, y no debida a una alta velocidad de dilución. Lo anterior representa una menor carga para los dispositivos de carga al biorreactor, y por lo tanto, menor consumo de potencia de bombeo. Adicionalmente se garantiza una alta conversión de sustrato y un buen rendimiento de producto, lo cual beneficia las etapas de separación posteriores.

Tabla 7. Indicativos de producción obtenidos a ciertas condiciones de operación establecidas para el sistema de fermentación con *Zymomonas mobilis*.

C_{sf} (g/L)	D (h ⁻¹)	C_p (g/L)	P_p (g/L h)	Conversión de sustrato	Rendimiento de producto (g producto / g sustrato)
80	0.15	38	5.71	0.99	0.475
160	0.15	76	11.4	0.99	0.475
160	0.1	76.7	7.67	0.99	0.479
120	0.1	56.77	5.67	0.99	0.473
120	0.25	54.6	13.66	0.96	0.455

3.1.4 Respuesta Dinámica del Sistema

La **Figura 5** representa la respuesta dinámica del sistema de fermentación con *Zymomonas mobilis* operado a $C_{sf} = 160$ g/L y $D = 0.15$ h⁻¹, para diferentes condiciones iniciales de operación. Para la simulación se considera una concentración inicial de células viables, $C_{x_{vo}}$, de 2 g/L, y una concentración inicial de componente clave, C_{e_o} , de 0.05 g/L. Se analiza la respuesta del sistema para concentraciones iniciales de sustrato, C_{s_o} , entre 0 y 150 g/L, y concentraciones iniciales de producto, C_{p_o} , entre 0 y 40 g/L. Los resultados indican que el proceso tarda en estabilizarse alrededor de 30 horas. Según las condiciones de arranque para el biorreactor, se puede alcanzar uno de los dos estados estacionarios estables predichos en el diagrama de bifurcación (**Figura 2**). También, se observa que es posible que el sistema se acerque al estado estable tipo nodo y luego se desvíe, al cabo de 20 horas, hacia el estado estacionario tipo foco, ocasionando que caiga la concentración de producto. Esto ocurre, por ejemplo, cuando se parte de $C_{s_o} = 0$ y $C_{p_o} = 20$ g/L. En general este estado estacionario se alcanza cuando se parte de concentraciones de sustrato muy bajas (0 – 50 g/L), en comparación a la concentración de sustrato en la alimentación, y de altas concentraciones de producto (20 – 40 g/L). Según los resultados obtenidos con la **Figura 5**, se considera que para alcanzar el estado estacionario estable objetivo, se debe arrancar el sistema con una carga mínima de concentración de sustrato igual a 60 g/L y una concentración de producto máxima de 10 g/L.

En conclusión, a partir del análisis de estabilidad realizado para el sistema de producción de etanol con *Zymomonas mobilis* se establecieron, bajo un criterio técnico, unas condiciones de operación que garantizan el alcance y mantenimiento de un estado estacionario estable de alto rendimiento y alta productividad. Estas condiciones se resumen en la **Tabla 8**.

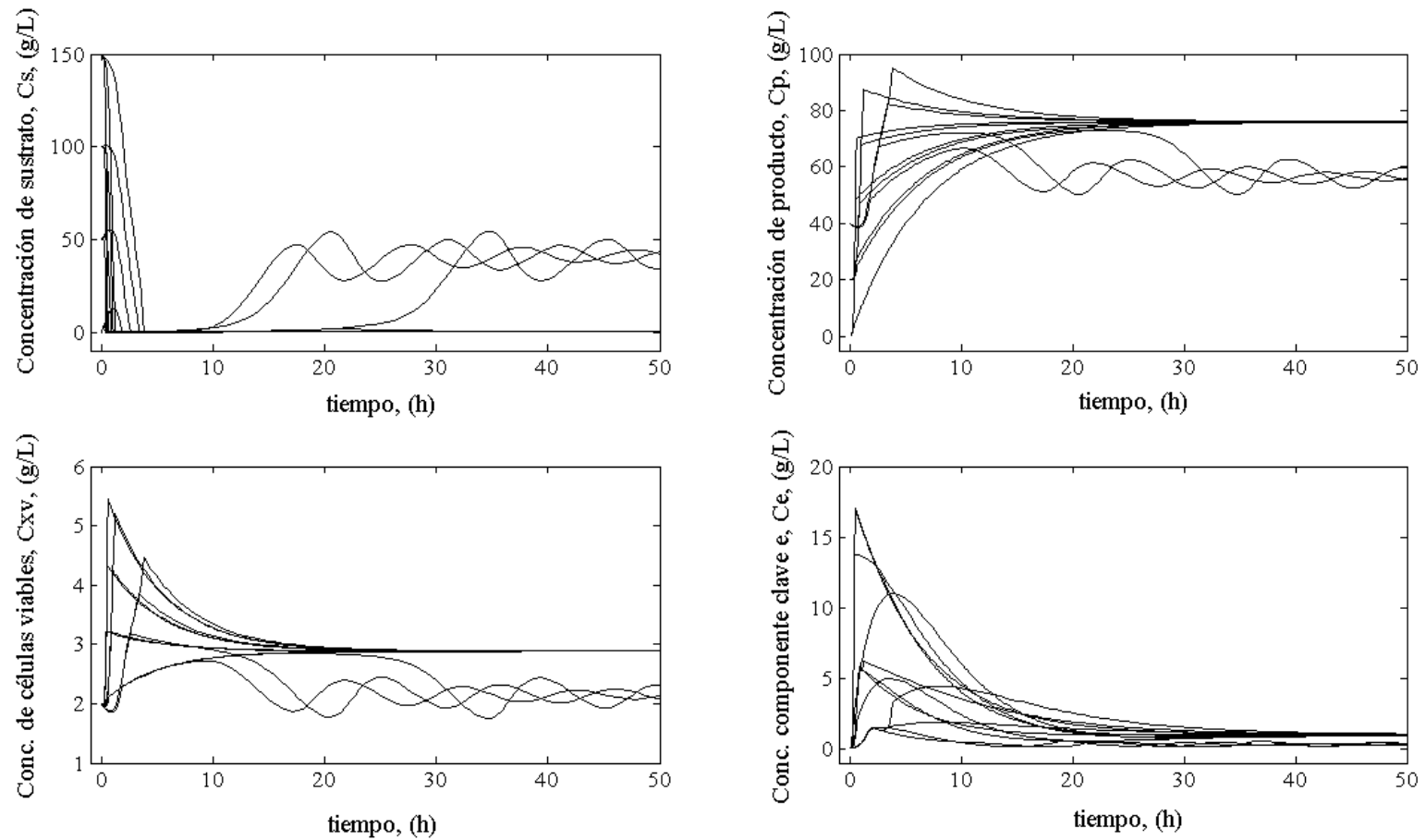


Figura 5. Respuesta dinámica del sistema de fermentación con *Zymomonas mobilis* operado a $C_{sf}=160$ g/L y $D=0.15$ h⁻¹, para diferentes condiciones iniciales de operación.

Tabla 8. Condiciones de operación establecidas para la producción de etanol por fermentación con *Zymomonas mobilis*.

Parámetro de operación	Valor
Concentración de sustrato en la alimentación, C_{s_f}	160 g/L
Velocidad de dilución, D	0.15
Concentración de sustrato en la carga inicial, C_{s_o}	Mayor o igual a 60 g/L
Concentración de producto en la carga inicial, C_{p_o}	Menor o igual a 10 g/L
Concentración de células viables en la carga inicial, $C_{x_{v_o}}$	2 g/L
Estado estacionario alcanzado	
Concentración de sustrato, C_s	0.37 g/L
Concentración de producto, C_p	76 g/L
Concentración de biomasa, C_x	2,8 g/L
Concentración de componente clave e, C_e	1 g/L

3.1.5 Evaluación de la Respuesta del Sistema ante Cambios en los Parámetros Durante la Operación Utilizando *Aspen Custom Modeler*

Con el objeto de evaluar el comportamiento del sistema ante cambios en los parámetros de operación durante el transcurso del proceso, el modelo matemático fue resuelto en *Aspen Custom Modeler*, y el proceso se simuló en modo dinámico. Se establecieron las condiciones de operación determinadas en la sección anterior para alcanzar el estado estable objetivo (Ver **Tabla 8**), y se efectuaron perturbaciones tipo rampa en la concentración de sustrato en la alimentación, y en la velocidad de flujo volumétrica de entrada al biorreactor (que afecta directamente la velocidad de dilución) asumiendo para el proceso un volumen de operación de 10.000 L.

La **Figura 6** muestra el comportamiento del proceso de fermentación, cuando se efectúa una rampa en el flujo volumétrico de alimentación al comienzo del proceso. Esta perturbación simula la etapa de arranque de la operación continua del biorreactor en la cual se incrementa de forma progresiva el flujo de alimentación hasta alcanzar la velocidad de dilución especificada. Los resultados indican que, bajo las condiciones establecidas, el incremento progresivo del flujo de alimentación por un período de dos horas hasta alcanzar el valor objetivo, garantiza el alcance del estado estacionario deseado. Debido a la rápida

caída en la concentración de sustrato, tiempos de arranque más prolongados pueden no asegurar el suministro necesario de azúcares al sistema, generando una caída en la concentración de etanol.

La **Figura 7** describe el comportamiento del sistema, cuando el proceso sufre una inesperada caída en el flujo de alimentación; como es el caso de una falla en la bomba de carga. Así mismo, se simula una acción correctiva sobre la situación. Según los resultados, se observa que después de haber alcanzado el estado estable, una disminución en más del 50% de la velocidad de dilución, por un período de seis horas, no tiene un efecto significativo sobre las concentraciones en el biorreactor. Esto indica que el sistema, después de que alcanza el estado estable, es poco sensible a cambios en este parámetro.

La **Figura 8** presenta la respuesta del sistema cuando hay una disminución en la concentración de sustrato en la alimentación. Perturbaciones de este tipo la sufren plantas productoras cuando utilizan materias primas con diferente contenido de azúcares, ya sea por el tipo o la procedencia de la materia prima. Según la **Figura 8**, el sistema es altamente sensible a variaciones en este parámetro. De manera que una caída en la concentración de sustrato de 40 g/L, lleva al sistema, de manera casi inmediata, a otro estado estable de menor concentración de producto.

Al igual que en cualquier proceso, las fermentaciones industriales están expuestas a diferentes perturbaciones en los parámetros de operación. Por lo tanto, es necesario evaluar, no solo las condiciones para alcanzar un estado estable deseado, si no también las condiciones para mantenerlo durante todo el período de producción. Conocer la respuesta del sistema ante tales variaciones permitirá formular estrategias de control efectivas.

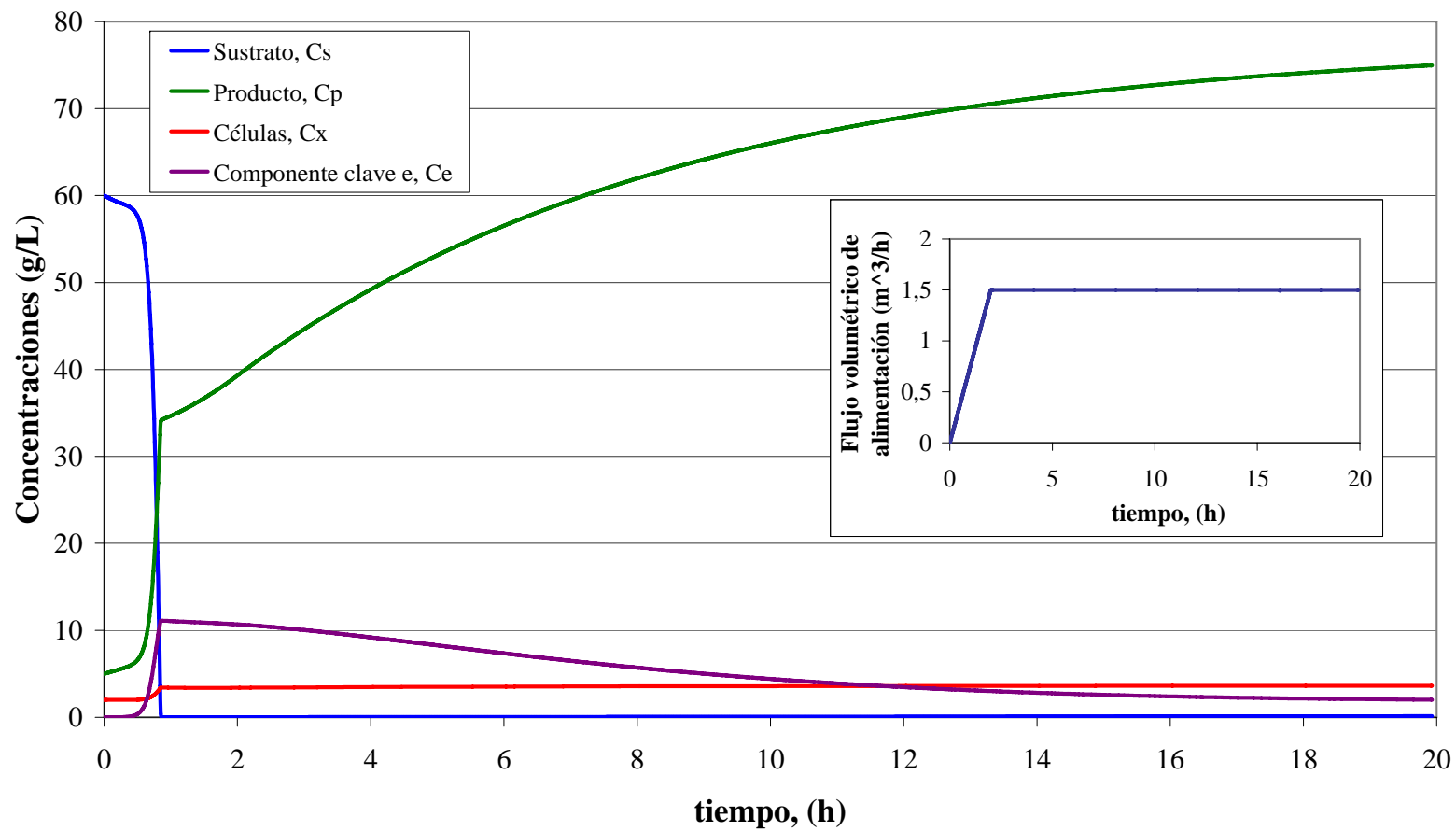


Figura 6. Comportamiento del proceso de fermentación con *Zymomonas mobilis* ante variaciones del flujo volumétrico de alimentación durante el arranque del biorreactor.

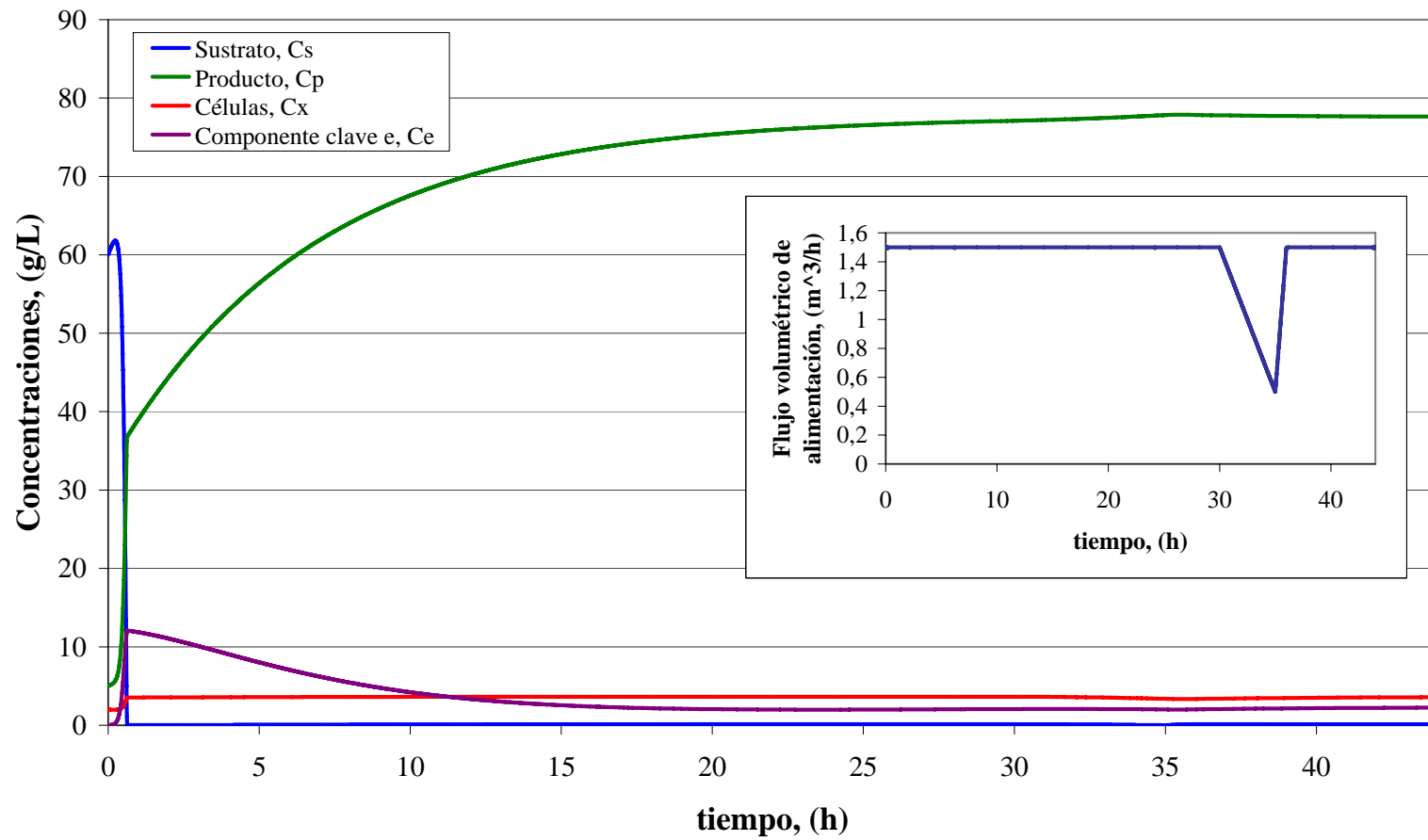


Figura 7. Comportamiento del proceso de fermentación con *Zymomonas mobilis* ante variaciones del flujo volumétrico de alimentación después de alcanzar el estado estable.

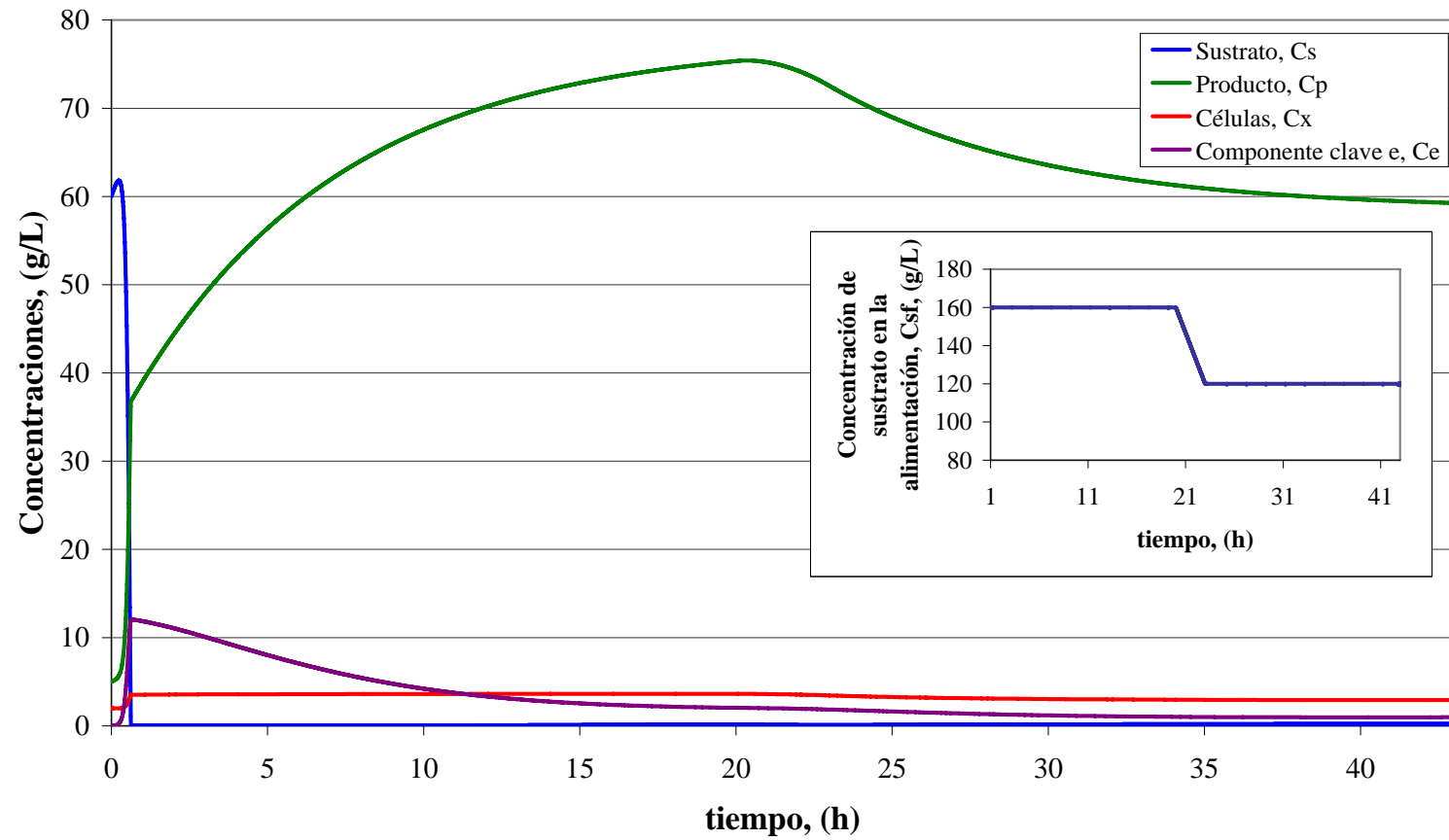


Figura 8. Comportamiento del proceso de fermentación con *Zymomonas mobilis* ante variaciones en la concentración de sustrato en la alimentación.

3.2 CASO DE ESTUDIO II. PRODUCCIÓN DE ETANOL CON *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

3.2.1 Modelo Matemático

Se analiza la producción de etanol por fermentación con la levadura *Saccharomyces cerevisiae* en un biorreactor continuo de tanque agitado. El comportamiento dinámico del sistema se evaluó utilizando el modelo, tipo no-estructurado – segregado simple, formulado por Jarzebski (Jarzebski, 1992), para reproducir el comportamiento oscilatorio de cultivos continuos de este microorganismo. Las Ecuaciones 20 a 32 comprenden las expresiones matemáticas, y en la **Tabla 9** se resume el valor de las constantes del modelo.

$$\frac{dC_s}{dt} = D(C_{s_f} - C_s) - R_s \quad (20)$$

$$\frac{dC_p}{dt} = D(C_{p_f} - C_p) + R_p \quad (21)$$

$$\frac{dC_{x_v}}{dt} = D(C_{x_{v_f}} - C_{x_v}) + R_{x_v} \quad (22)$$

$$\frac{dC_{x_{nv}}}{dt} = D(C_{x_{nv_f}} - C_{x_{nv}}) + R_{x_{nv}} \quad (23)$$

$$\frac{dC_{x_d}}{dt} = D(C_{x_{d_f}} - C_{x_d}) + R_{x_d} \quad (24)$$

$$R_s = \frac{\mu_v}{Y_{XS}} C_{x_v} + m_s C_{x_{nv}} \quad (25)$$

$$Rp = \frac{\mu_v}{Y_{XP}} C_{X_v} + m_p C_{X_{nv}} \quad (26)$$

$$Rx_v = (\mu_v - \mu_{nv} - \mu_d) C_{X_v} \quad (27)$$

$$Rx_{nv} = \mu_{nv} C_{X_v} - \mu_d C_{X_{nv}} \quad (28)$$

$$Rx_d = \mu_d (C_{X_v} + C_{X_{nv}}) \quad (29)$$

$$\mu_v = \mu_{max} \frac{Cs}{K_1 + Cs} \left(1 - \frac{Cp}{Cp_c} \frac{Cs}{K_2 + Cs} \right) \quad (30)$$

$$\mu_{nv} = \mu'_{max} \frac{Cs}{K_1 + Cs} \left(1 - \frac{Cp}{Cp'_c} \frac{Cs}{K_2 + Cs} \right) - \mu_v \quad (31)$$

$$\mu_d = -\mu_v \quad (32)$$

Donde Cp es la concentración de producto en g/L, Cp_c es la concentración de etanol limitante para células viables en g/L, Cp'_c es la concentración de etanol limitante para células no viables en g/L, Cs es la concentración de sustrato en g/L, Cx_d es la concentración de células muertas en g/L, Cx_{nv} es la concentración de células no viables en g/L, Cx_v es la concentración de células viables en g/L, D es la velocidad de dilución en h^{-1} , K_1 y K_2 son las constantes de saturación en g/L, m_p es el factor de mantenimiento de etanol en h^{-1} , m_s es el factor de mantenimiento de sustrato en h^{-1} , P_p es la productividad del etanol en g/L h = $D * Cp$, Rp es la velocidad de formación de producto en g/L h, Rs es la velocidad de consumo de sustrato en g/L h, Rx_d es la velocidad de formación de células muertas en g/L h, Rx_{nv} es la velocidad de formación de células no viables en g/L h, Rx_v es la velocidad de formación de células viables en g/L h, t es el tiempo en h, $Y_{x/p}$ es el coeficiente de rendimiento en conversión de biomasa a etanol, $Y_{x/s}$ es el coeficiente de rendimiento en

conversión de biomasa a sustrato, μ_d es la velocidad de formación de células muertas en h^{-1} , μ_{max} es la velocidad de crecimiento máxima de células viables en h^{-1} , μ'_{max} es la velocidad de crecimiento máxima sobre células no viables en h^{-1} , μ_{nv} es la velocidad de crecimiento de células no viables en h^{-1} , μ_v es la velocidad de crecimiento de células viables en h^{-1} , el subíndice f significa en la alimentación, y el subíndice o significa condición inicial.

Tabla 9. Constantes para el modelo de fermentación con *Saccharomyces cerevisiae*.

Constantes	Valor	Constantes	Valor
μ_{max}	0.25 h^{-1}	$Y_{x/s}$	0.095 g/g
μ'_{max}	0.21 h^{-1}	$Y_{x/p}$	0.235 g/g
K_1	3 g/L	m_s	4.42 g/g h
K_2	3 g/L	m_p	2.6 g/g h
Cp_c	70 g/L	Cp'_c	130 g/m^3

3.2.2 Efecto de la Velocidad de Dilución

La **Figuras 9 y 10** muestran los diagrama de bifurcación obtenidos para las concentraciones de sustrato, de producto y de células viables, así como para la productividad, en función de la velocidad de dilución, para una concentración de sustrato en la alimentación de 100 y 120 g/L, respectivamente.

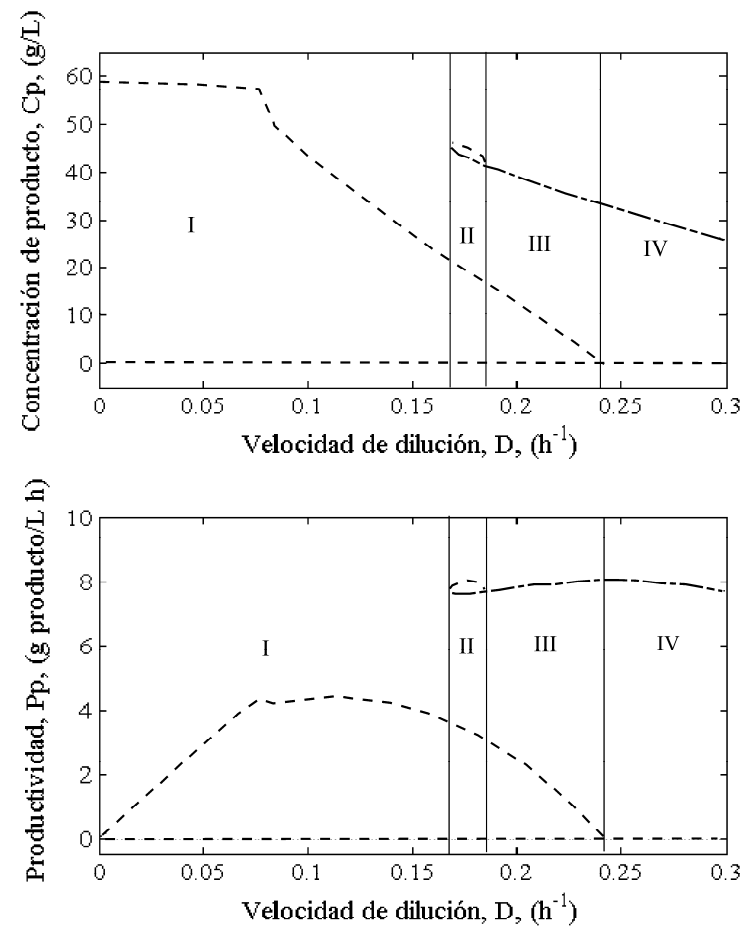
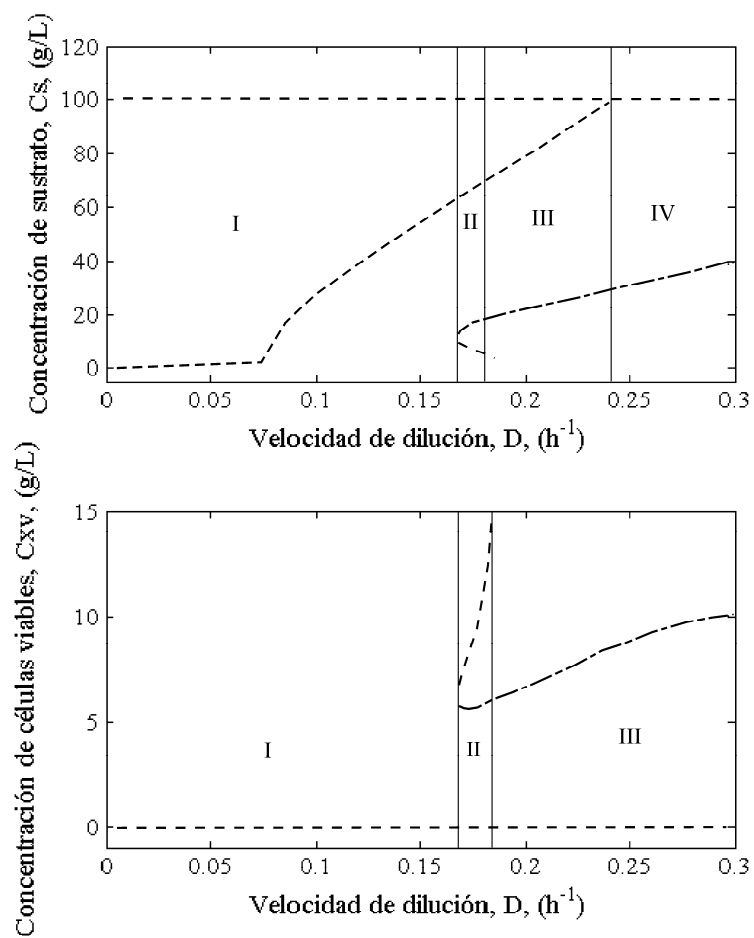


Figura 9. Diagrama de bifurcación para sistema de producción de etanol con *Saccharomyces cerevisiae*. $C_{sf} = 100$ g/L.

(----- EE inestable, ——— EE foco estable)

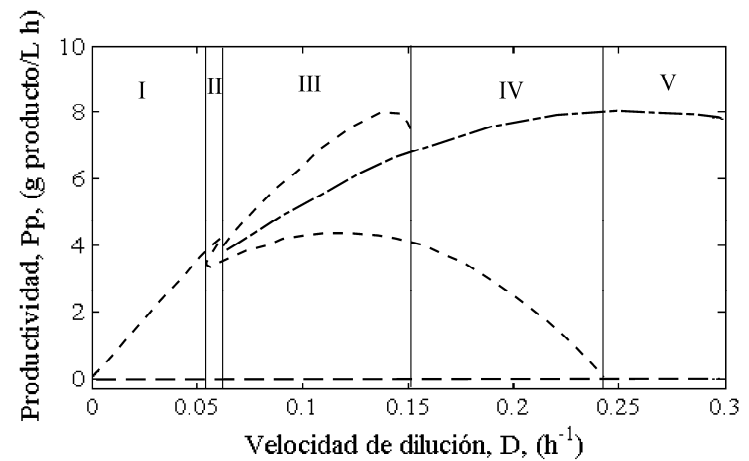
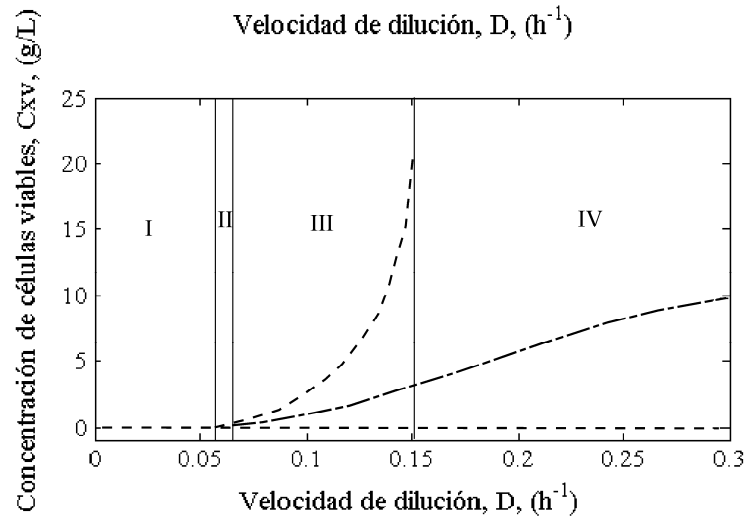
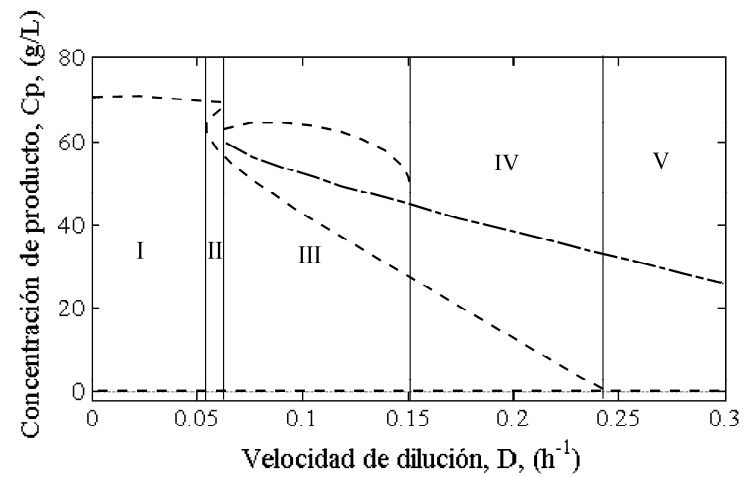
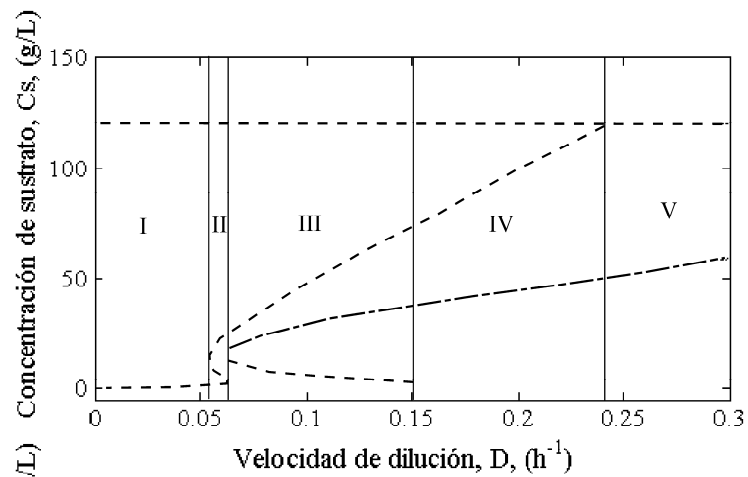


Figura 10. Diagrama de bifurcación para sistema de producción de etanol con *Saccharomyces cerevisiae*. $C_{sf} = 120$ g/L.

(----- EE inestable, ——— EE foco estable)

Los diagramas de bifurcación se analizaron de la misma forma en que se examinaron los diagramas para el sistema de producción de alcohol con *Zymomonas mobilis*. La **Figura 9** muestra que el sistema, para una concentración de sustrato en la alimentación de 100 g/L, y velocidades de dilución entre 0.001 y 0.3 h⁻¹, presenta multiplicidad de estados estacionarios. La **Tabla 10** resume la distribución de las regiones de estabilidad para las condiciones analizadas.

El número de ramas de EE, varía entre 2 y 4, dependiendo de la sección del intervalo seleccionada. Sin embargo, de todas las ramas de estados estacionarios, solo una es estable, la cual se caracteriza por ser tipo foco. Esta rama se puede alcanzar a velocidades de dilución entre 0.168 y 0.3 h⁻¹. La máxima productividad de etanol que se puede alcanzar para todo el intervalo de D analizado, es 8 g/L h, la cual se logra a una velocidad de dilución igual a 0.245 h⁻¹, y le corresponde una concentración de producto de 32.7 g/L.

La **Figura 10**, muestra el diagrama de bifurcación para una concentración de sustrato en la alimentación de 120 g/L. A una velocidad de dilución de 0.17 h⁻¹, se puede alcanzar una concentración de producto de 42.2 g/L, con una concentración de sustrato residual igual a 40.1 g/L, y una productividad de 7.2 g/L h. A velocidades de dilución menores a 0.17 h⁻¹, la productividad es muy baja, y además, se opera en una región de múltiples estados estacionarios inestables muy próximos, lo cual debe tenerse en cuenta para un proceso de respuesta lenta como es el caso de una fermentación. Para velocidades de dilución mayores a 0.17 h⁻¹, la concentración de sustrato residual se incrementa demasiado.

Al comparar la **Figura 9** con la **Figura 10**, se aprecia la evolución de las ramas de estados estacionarios y de las bifurcaciones. A medida que se aumenta C_{S_f} , la rama de estados estables se fusiona con una rama de estados inestables. De manera que a altas C_{S_f} se amplía el rango de valores de D para el cual existen estados estacionarios estables.

3.2.3 Efecto de la Concentración de Sustrato en la Alimentación

Las **Figuras 11** y **12** presentan los diagramas de bifurcación para las concentraciones de sustrato, de producto y de células viables, y para la productividad, en función de la concentración de sustrato en la alimentación, para una velocidad de dilución de 0.17 y 0.25 h^{-1} , respectivamente. La **Tabla 10** resume el análisis de los diagramas en función de las regiones de estabilidad observadas.

Tabla 10. Distribución de las regiones de estabilidad determinadas para el sistema de fermentación con *Saccharomyces cerevisiae*.

Parámetro fijo	Número de regiones	Región	Parámetro de bifurcación		Estados estacionarios
$C_{sf} = 100 \text{ g/L}$	4	Región I	$D \text{ (h}^{-1}\text{)}$	0.001 – 0.168	2 EE inestables
		Región II		0.168 – 0.185	4 EE: 3 inestables, 1 foco estable
		Región III		0.168 – 0.243	3 EE: 2 inestable, 1 foco estable
		Región IV		0.243 – 0.3	2 EE: 1 inestable, 1 foco estable
$C_{sf} = 120 \text{ g/L}$	5	Región I	$D \text{ (h}^{-1}\text{)}$	0.001 – 0.055	2 EE inestables
		Región II		0.055 – 0.063	4 EE inestables
		Región III		0.063 – 0.151	4 EE: 3 inestables, 1 foco estable
		Región IV		0.151 – 0.244	3 EE: 2 inestables, 1 foco estable
		Región V		0.244 – 0.3	2 EE: 1 inestable, 1 foco estable.
$D = 0.17 \text{ h}^{-1}$	3	Región I	$C_{sf} \text{ (g/L)}$	60 – 99	2 EE inestables
		Región II		99 – 108	4 EE: 3 inestables, 1 foco estable
		Región III		108 – 120	3 EE: 2 inestables, 1 foco estable
$D = 0.25 \text{ h}^{-1}$	2	Región I	$C_{sf} \text{ (g/L)}$	60 – 79	1 EE inestable
		Región II		79 – 120	2 EE: 1 inestable, 1 foco estable

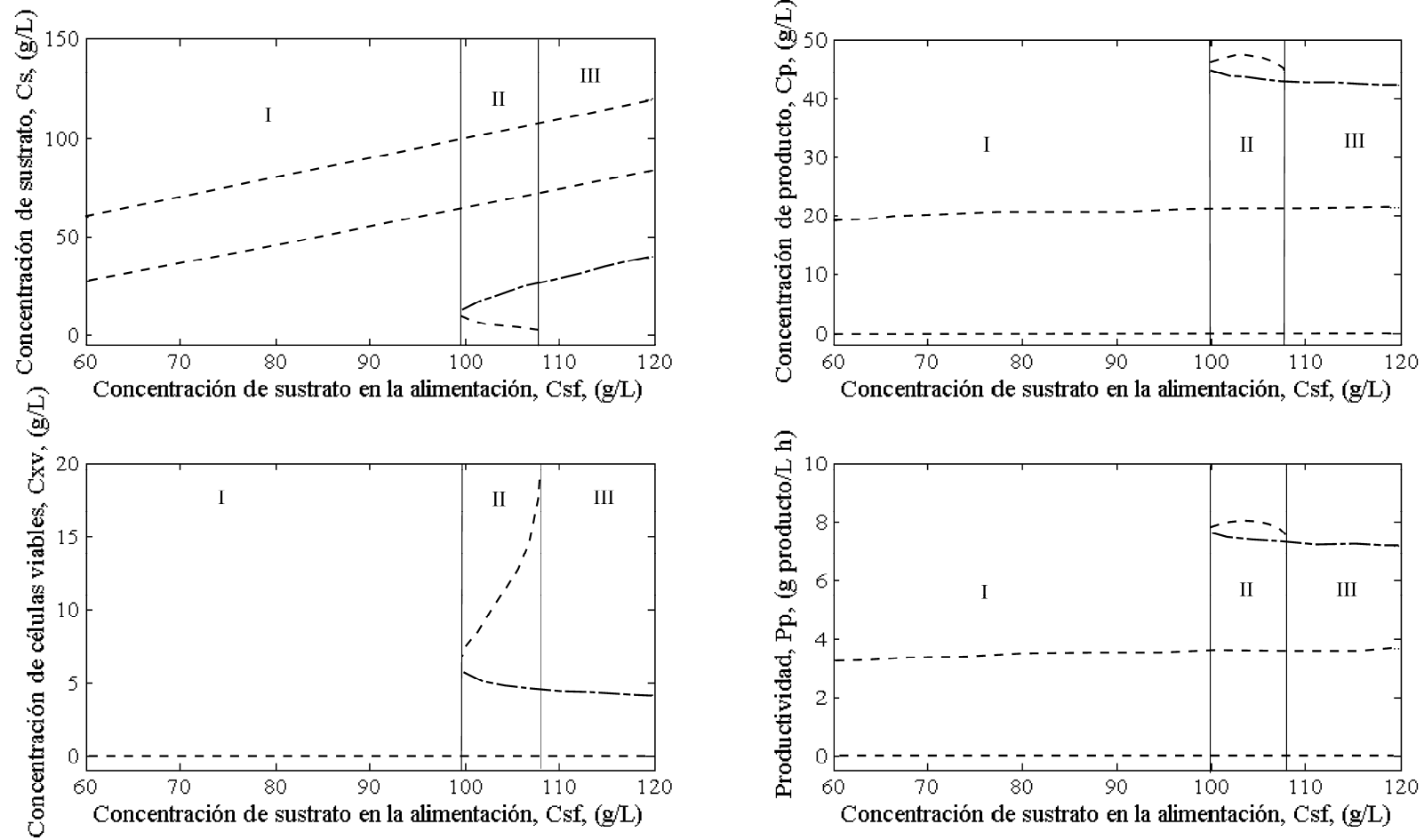


Figura 11. Diagrama de bifurcación para sistema de producción de etanol con *Saccharomyces cerevisiae*. $D = 0.17 \text{ h}^{-1}$.

(----- EE inestable, ——— EE foco estable)

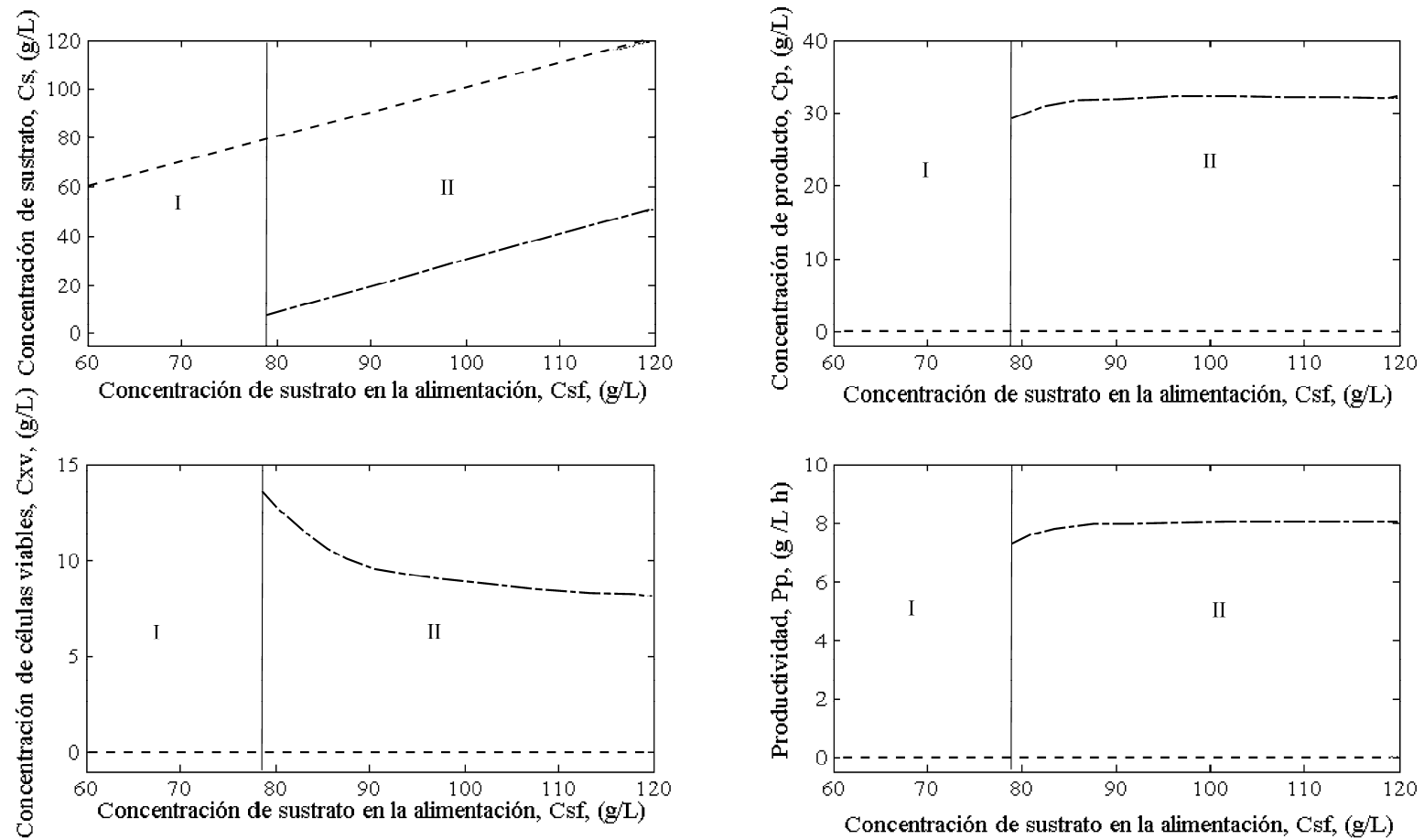


Figura 12. Diagrama de bifurcación para sistema de producción de etanol con *Saccharomyces cerevisiae*. $D = 0.25 \text{ h}^{-1}$.

(----- EE inestable, ——— EE foco estable)

Al comparar la **Figura 11** con la **Figura 12**, se observa que a una mayor velocidad de dilución se reduce el número de estados estacionarios, y que el rango de concentraciones de sustrato en la alimentación dentro del cual se pueden alcanzar EE estables se amplía, de manera que se puede operar el proceso a C_{sf} más bajas. Así, para una velocidad de dilución de 0.17 h^{-1} , se logran EE estables para C_{sf} entre 99 y 120 g/L, mientras que a una $D = 0.25 \text{ h}^{-1}$, el alcance de EE estables se logra para un intervalo de C_{sf} entre 79 y 120 g/L.

La **Tabla 11** resume la productividad, la conversión de sustrato y el rendimiento de producto que se obtienen a ciertas condiciones de operación seleccionadas para el sistema analizado. Las condiciones correspondientes a $C_{sf} = 100 \text{ g/L}$ y $D = 0.2 \text{ h}^{-1}$, se escogen como una de las más apropiadas para operar el proceso, ya que se logra una alta productividad debido a una alta concentración de producto a la salida; razón por la cual se obtiene un alto rendimiento con una buena conversión de sustrato. Las condiciones seleccionadas, no exigen un flujo volumétrico de entrada elevado, lo que significa menor consumo de potencia de bombeo. Además, debido a la alta concentración de producto a la salida, se reduce el consumo de energía en etapas de separación posteriores.

Tabla 11. Indicativos de producción obtenidos a ciertas condiciones de operación establecidas para el sistema de fermentación con *Saccharomyces cerevisiae*.

C_{sf} (g/L)	D (h^{-1})	C_p (g/L)	P_p (g/L h)	Conversión de sustrato	Rendimiento de producto (g producto / g sustrato)
100	0.2	39.1	7.8	0.79	0.39
120	0.17	42.2	7.1	0.67	0.35
110	0.17	42.7	7.2	0.74	0.39
85	0.25	31.4	7.8	0.85	0.37

3.2.4 Respuesta Dinámica del Sistema

La **Figura 13** es el diagrama de fases para la concentración de producto y de células viables del sistema de fermentación con *Saccharomyces cerevisiae* operado a una concentración de sustrato en la alimentación igual a 100 g/L, y una velocidad de dilución igual a 0.2 h^{-1} . En este diagrama se presenta una aproximación de las trayectorias del proceso cuando parte de diferentes concentraciones iniciales hasta alcanzar el estado estacionario. Para construir el diagrama se evaluó el comportamiento del sistema partiendo de concentraciones iniciales de sustrato, C_{s_o} , entre 20 y 100 g/L, concentraciones iniciales de producto, C_{p_o} , entre 10 y 50 g/L, y concentraciones iniciales de células viables, C_{xv_o} , entre 5 y 10 g/L. Para todas las condiciones iniciales evaluadas, se alcanza el único estado estacionario estable predicho con el diagrama de bifurcación. Según los resultados obtenidos, se considera que para alcanzar el estado estacionario estable objetivo, se debe arrancar el sistema con una concentración de sustrato igual o mayor a 60 g/L, con el fin de que la concentración de sustrato en el biorreactor no caiga demasiado durante las primeras horas de operación. Así mismo se recomienda iniciar el proceso continuo con una concentración inicial de producto igual a 10 g/L, y de células viables mínima de 2 g/L.

La **Figura 14** representa la respuesta dinámica del sistema operado a $C_{s_f} = 100 \text{ g/L}$, y $D = 0.2 \text{ h}^{-1}$. Las condiciones iniciales consideradas para la simulación son: $C_{s_o} = 60 \text{ g/L}$, $C_{p_o} = 10 \text{ g/L}$, $C_{x_{vo}} = 2 \text{ g/L}$, $C_{x_{nvo}} = 0.5 \text{ g/L}$, y $C_{x_{do}} = 0$. Los resultados indican que el proceso tarda alrededor de 100 horas para estabilizarse en el estado estacionario predicho. En la **Tabla 12** se resumen las condiciones de operación para el sistema de producción de etanol con *Saccharomyces cerevisiae* establecidas con el análisis de estabilidad.

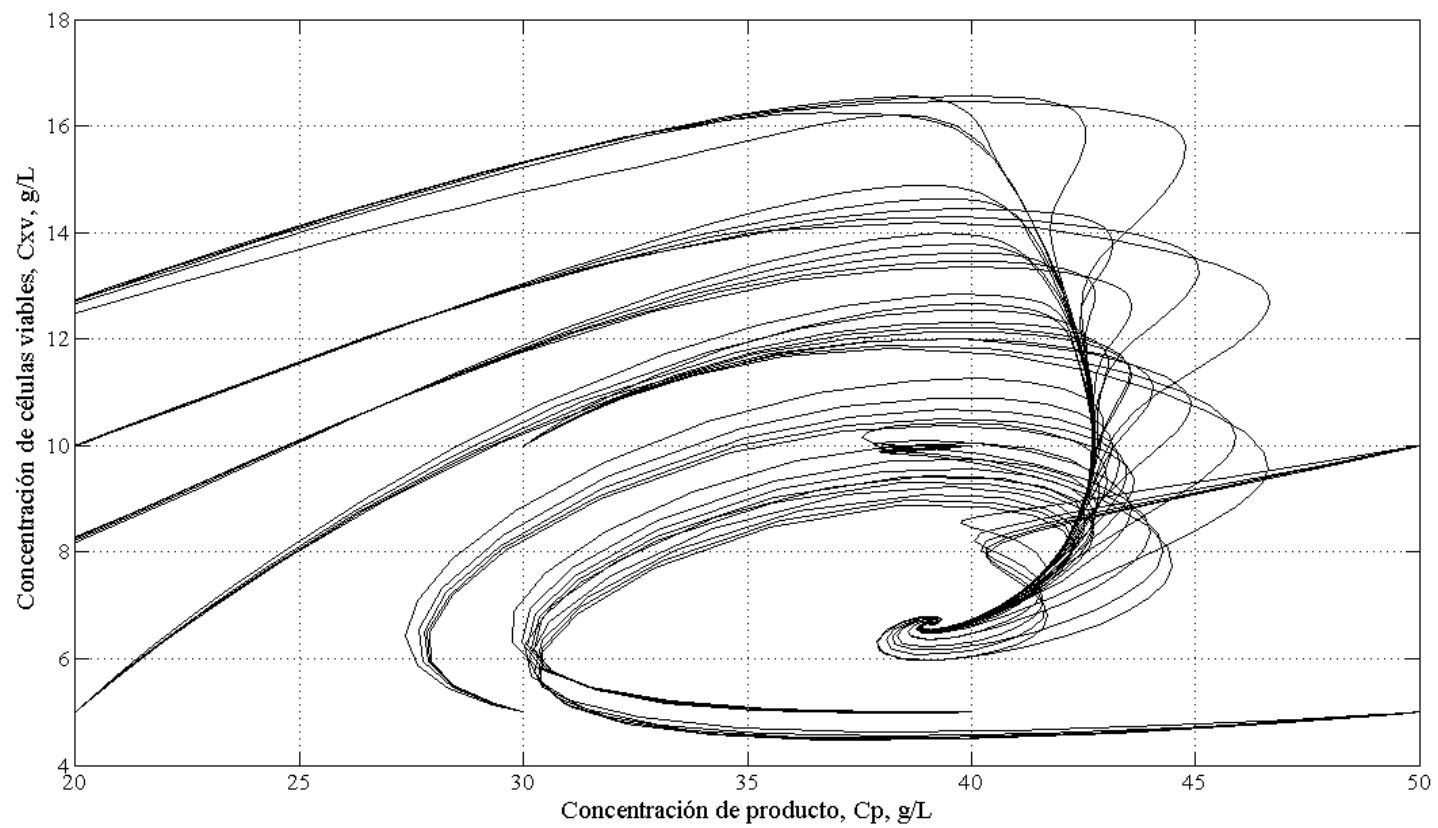


Figura 13. Diagrama de fase para el sistema de fermentación con *Saccharomyces cerevisiae* operado a $C_{S_f} = 100$ g/L y $D = 0.2$ h⁻¹.

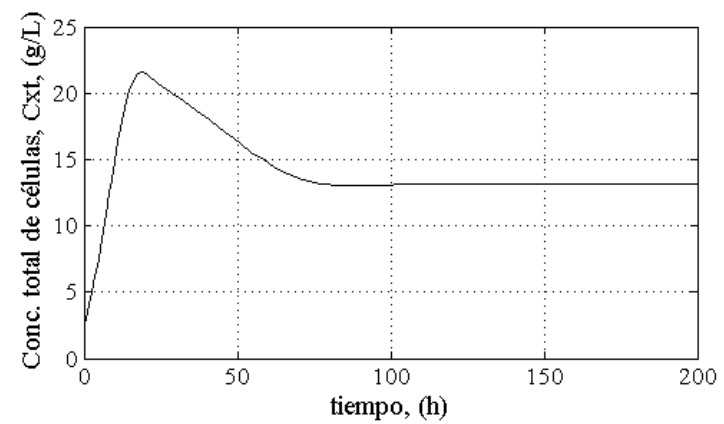
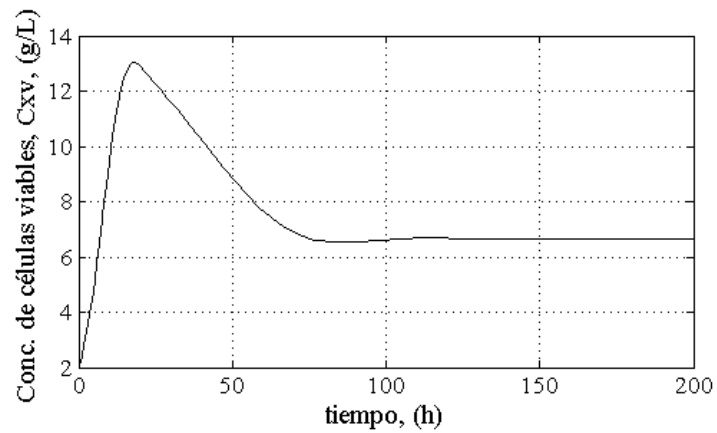
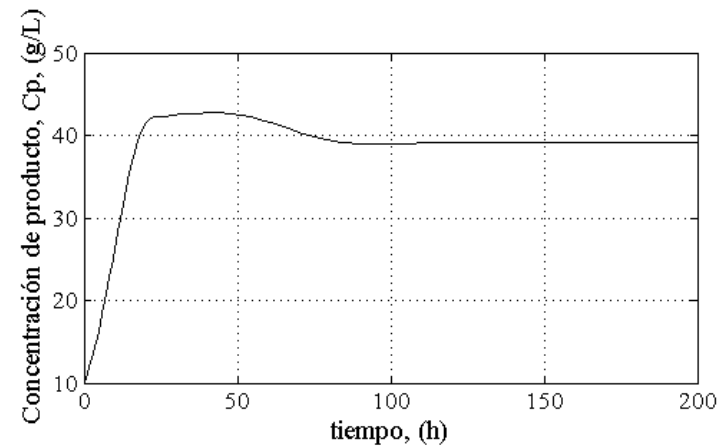
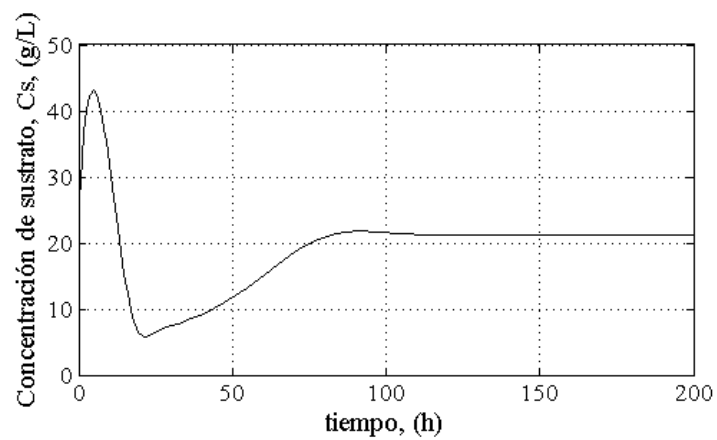


Figura 14. Respuesta dinámica del sistema de fermentación con *Saccharomyces cerevisiae* operado a $C_{sf} = 100$ g/L y $D = 0.2$ h⁻¹.

Tabla 12. Condiciones de operación establecidas para la producción de etanol por fermentación con *Saccharomyces cerevisiae*.

Parámetro de operación	Valor
Concentración de sustrato en la alimentación, C_{s_f}	100 g/L
Velocidad de dilución, D	0.2 h ⁻¹ .
Concentración de sustrato en la carga inicial, C_{s_o}	Mayor o igual a 60 g/L
Concentración de producto en la carga inicial, C_{p_o}	10 g/L
Concentración de células viables en la carga inicial, $C_{x_{vo}}$	2 g/L
Concentración de células no viables en la carga inicial, $C_{x_{nvo}}$	0.5 g/L
Concentración de células muertas en la carga inicial, $C_{x_{do}}$	0
Estado estacionario alcanzado	
Concentración de sustrato, C_s	21.2 g/L
Concentración de producto, C_p	39.1 g/L
Concentración de células viables, C_x	6.6 g/L
Concentración de células no viables, $C_{x_{nv}}$	1.7 g/L
Concentración de células muertas, C_{x_d}	0

3.3 SISTEMA ANAERÓBICO CON AGITACIÓN

3.3.1 Modelo Matemático

Se estudia el comportamiento dinámico de un sistema de fermentación anaeróbico con agitación, con el fin de evaluar el comportamiento del fenómeno de desorción de CO₂ en la fermentación con *Saccharomyces cerevisiae* en función de la velocidad de flujo de gas, la velocidad de agitación, el pH y la temperatura. La respuesta del sistema se modeló con las expresiones matemáticas descritas en las Ecuaciones 33 a 52. En la **Tabla 13** se resumen el valor de las constantes del modelo, y de otros parámetros establecidos para el sistema.

$$\frac{dC_{CO_2,l}}{dt} = K_L a_{CO_2} (C_{CO_2}^* - C_{CO_2,l}) + q_{CO_2} C_x \quad (33)$$

$$\frac{dC_{CO_2,g}}{dt} = \frac{F_g}{V_g} (C_{CO_2,in} - C_{CO_2,g}) - K_L a_{CO_2} (C_{CO_2}^* - C_{CO_2,l}) \frac{V_l}{V_g} \quad (34)$$

$$C_{CO_2}^* = H_{CO_2} C_{CO_2,g} \frac{RT}{PM_{CO_2}} \quad (35)$$

$$K_L a_{CO_2} = K_L a_{O_2} \frac{D_{CO_2}}{D_{O_2}} \quad (\text{Nielsen et al., 2004}) \quad (36)$$

Para aireación en la superficie (caldo anaeróbico) con una turbina Rushton en cultivos de *Saccharomyces cerevisiae* (Galaction et al., 2004):

$$K_L a_{O_2} s = \frac{l}{e^{11.64+0.307 \ln Cx}} \left(\frac{P}{V} \right)^{1.14-0.187 \ln Cx} \quad (37)$$

$$q_{CO_2} = \frac{\mu_v}{Y_{X/CO_2}} + \frac{\mu_v}{Y_{P/CO_2}} \quad (38)$$

$$Y_{X/CO_2} = \frac{Y_{XS}}{Y_{CO_2/glu cosa}} \quad (39)$$

$$Y_{P/CO_2} = \frac{Y_{X/CO_2}}{Y_{X/P}} \quad (40)$$

$$H_{CO_2} = K_H * PM_{CO_2} \quad (41)$$

$$K_H = \frac{0.0333 * C_H^2}{C_H^2 + C_H K_1 + K_1 K_2} \quad (\text{Mook, 2000; Snoeyink and Jenkins, 1990}) \quad (42)$$

$$K_1 = 10^{-pK_1} \quad (43)$$

$$K_2 = 10^{-pK_2} \quad (44)$$

$$C_H = 10^{-pH} \quad (45)$$

$$pK_1 = \frac{3404.71}{T} + 0.032786 \times T - 14.8435 \quad (\text{Mook, 2000}) \quad (46)$$

$$pK_2 = \frac{2902.39}{T} + 0.02379 \times T - 6.4980 \quad (\text{Mook, 2000}) \quad (47)$$

$$Re_i = \frac{N_i \times D_i^2 \times \rho}{\mu} \quad (48)$$

$$N_i = \frac{N_a}{60} \quad (49)$$

Para:

$$Re_i < 10 \quad P = 1000 \times k_{imp} \times \mu \times N_i^2 \times D_i^3 \quad (50)$$

$$Re_i > 10^4 \quad P = 1000 \times N_p \times \rho \times \mu \times N_i^3 \times D_i^5 \quad (51)$$

$$10 < Re_i < 10^4 \quad P = 1000 \times 5 \times \rho \times \mu \times N_i^3 \times D_i^5 \quad (\text{Doran, 1998}) \quad (52)$$

Donde $C_{CO_2,l}$ es la concentración de CO_2 en la fase líquida en g/L, $C_{CO_2,g}$ es la concentración de CO_2 en la fase gaseosa en g/L, $C_{CO_2,in}$ es la concentración de CO_2 que entra al biorreactor en g/L, $C_{CO_2}^*$ es la concentración de saturación del CO_2 en g/L, C_H es la concentración de ión hidronio en mol/Kg_{agua}, C_x es la concentración de biomasa en g/L, D_i es el diámetro del rodete en m, D_{CO_2} es el coeficiente de difusión del CO_2 en el caldo de

cultivo en m^2/s , D_{O_2} es el Coeficiente de difusión del O_2 en el caldo de cultivo en m^2/s , F_g es la velocidad de flujo volumétrica de la corriente de gas en L/h , H_{CO_2} es la constante de Henry en $\text{g}/\text{L atm}$, K_1 , K_2 son constantes de disociación de las especies del CO_2 en $\text{mol}/\text{Kg}_{\text{agua}}$, K_H es la constante de Henry en $\text{mol}/\text{L atm}$, k_{imp} es la constante de proporcionalidad para el rodete, $K_L a_{CO_2}$ es el coeficiente volumétrico de transferencia de masa para CO_2 en h^{-1} , $K_L a_{O_2}$ es el coeficiente volumétrico de transferencia de masa para O_2 en h^{-1} , $K_L a_{O_2 s}$ es el coeficiente volumétrico de transferencia de masa para O_2 en s^{-1} , N_a es la velocidad del agitador en rpm, N_i es la velocidad del agitador en s^{-1} , N_p es el número de potencia, P es el consumo de potencia para mezcla de caldos no aireados en W, PM_{CO_2} es el peso molecular del CO_2 en g/gmol , q_{CO_2} es la velocidad específica de producción de CO_2 en $\text{g}_{CO_2}/\text{g}_{\text{cel}} \text{ h}$, R es la constante de los gases ideales en $\text{atm L}/\text{mol K}$, Re_i es el Número de Reynold del rodete, T es la temperatura en K, V es el Volumen del medio en m^3 , V_g es el volumen de la fase gaseosa en L, V_l es el volumen de la fase líquida en L, Y_{xp} es el rendimiento de biomasa por gramo de etanol, Y_{p/CO_2} es el rendimiento etanol por gramo de CO_2 , $Y_{CO_2/\text{glucosa}}$ es el rendimiento teórico de CO_2 por gramo de glucosa, Y_{x/CO_2} es el rendimiento de biomasa por gramo de CO_2 , Y_{xs} es el rendimiento de biomasa por gramo de sustrato, ρ es la densidad del caldo de cultivo en Kg/m^3 , μ es la viscosidad del caldo de cultivo en $\text{Kg}/\text{m s}$, y μ_v es la velocidad específica de crecimiento de células viables en h^{-1} .

3.3.2 Efecto de los Parámetros de Operación

3.3.2.1 Velocidad de Flujo Volumétrica de la Corriente de Gas

La **Figura 15**, presenta el diagrama de bifurcación para la concentración de dióxido de carbono en la fase líquida, C_{CO_2l} , y la concentración de dióxido de carbono en la fase gaseosa, C_{CO_2g} , en función de la velocidad de flujo volumétrico de gas, F_g . El análisis fue llevado a cabo para el sistema de fermentación operando bajo las condiciones establecidas

previamente (Sección 3.2), las cuales se resumen en la **Tabla 13**. Para la construcción de este diagrama se fijó una temperatura de 32 °C, un pH de 4 y una velocidad de agitación de 200 rpm. El diagrama indica que el sistema presenta un estado estacionario estable para el rango de F_g analizado, el cual comprende entre 50 y 500 L/h. Se observa que este parámetro tiene un efecto notorio sobre la concentración de dióxido de carbono en ambas fases. Sin embargo, la variación más significativa se logra a una velocidad de flujo volumétrico de gas entre 50 y 400 L/h. Para F_g mayores, las concentraciones de estado estable que se logran son muy similares. Si se considera la importancia de desorber el CO_2 de la fase líquida con el fin de que no afecte el metabolismo de las células, y además de que no altere el pH de la fermentación debido a la disociación de sus especies, se considera que es necesario garantizar un flujo mínimo de salida de CO_2 de 300 L/h.

Tabla 13. Constantes para el modelo de transferencia de masa.

Constante o parámetro	Valor	Referencia
$C_{\text{CO}_2, \text{in}}$	0	Tabla 12
C_p	39.1 g/L	
C_s	21.2 g/L	
C_{xd}	0	
C_{xnv}	1.79 g/L	
C_{xv}	6.6 g/L	(Nielsen et al., 2004)
D_{CO_2}	$1.96 \times 10^9 \text{ m}^2/\text{s}$ (en soluciones acuosas diluidas a 25 °C)	
D_{O_2}	$2.5 \times 10^9 \text{ m}^2/\text{s}$ (en soluciones acuosas diluidas a 25 °C)	
D_i	0.75 m	
k_{imp}	70 (Para fluidos newtonianos sin aireación, turbina Rushton)	
N_p	6 (Para fluidos newtonianos sin aireación, turbina Rushton)	(Doran, 1998)
PM_{CO_2}	44 g/mol	(Nielsen et al., 2004)
R	0.082 atm L/mol K	
V	10 m^3	
V_g	1100 L	
V_l	10000 L	
$Y_{\text{CO}_2 / \text{glu} \cos a}$	0.489 g CO_2 /g glucosa	(Ribas et al., 2006)
Y_{xp}	0.235 g biomasa/g producto	
Y_{xs}	0.095 g biomasa/g sustrato	
ρ	1069 Kg/m ³	
μ	10^{-2} Kg/m s	

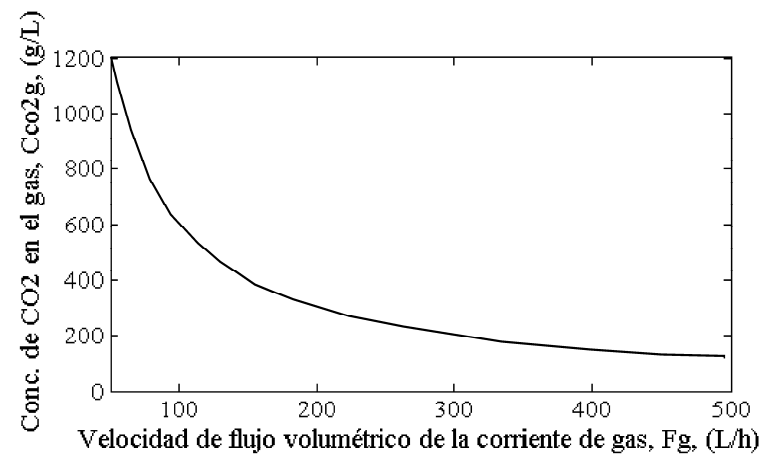
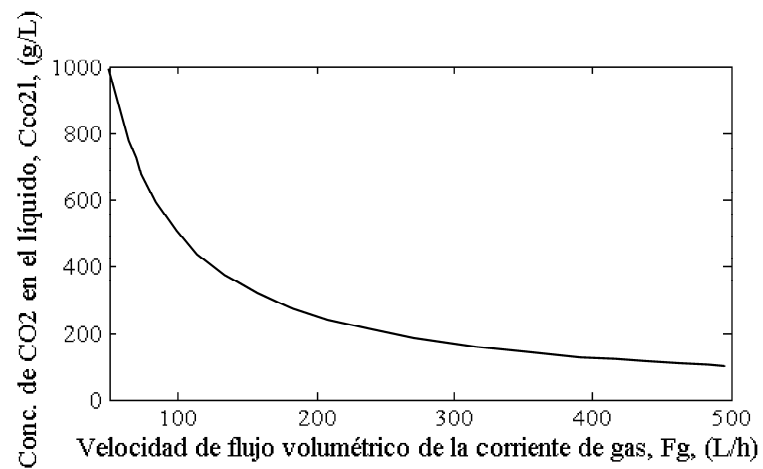


Figura 15. Diagrama de bifurcación para el sistema anaeróbico con agitación en la fermentación con *Saccharomyces cerevisiae*.

$Na = 200$ rpm, $pH = 4$, $T = 32$ °C (— EE nodo estable).

3.3.2.2 Velocidad de Agitación

La **Figura 16** representa los diagramas de bifurcación para las concentraciones de dióxido de carbono en la fase líquida y en la fase gaseosa, en función de la velocidad de agitación, Na , para valores entre 50 y 500 rpm. En la construcción del diagrama se consideró $Fg = 400$ L/h, $T = 32$ °C y $pH = 4$. Los resultados indican que el sistema exhibe un solo estado estacionario estable. También muestran que la velocidad de agitación es un parámetro que no afecta la concentración de dióxido de carbono en el gas, pero que sí afecta la concentración de CO_2 en el líquido, aunque de manera poco significativa. Se observa que para velocidades de agitación mayores a 250 rpm, la concentración de dióxido de carbono en la fase líquida, que se alcanza en estado estable es casi la misma.

La **Figura 17** muestra el consumo de potencia en función de la velocidad de agitación para el sistema analizado. En la Figura se observa que este parámetro tiene un efecto significativo sobre la potencia consumida para agitación. Por lo tanto, con el objeto de disminuir la concentración de CO_2 en la fase líquida, y además evitar un gasto excesivo e innecesario de energía para agitación, se recomienda que se trabaje a una velocidad de agitación máxima de 150 rpm.

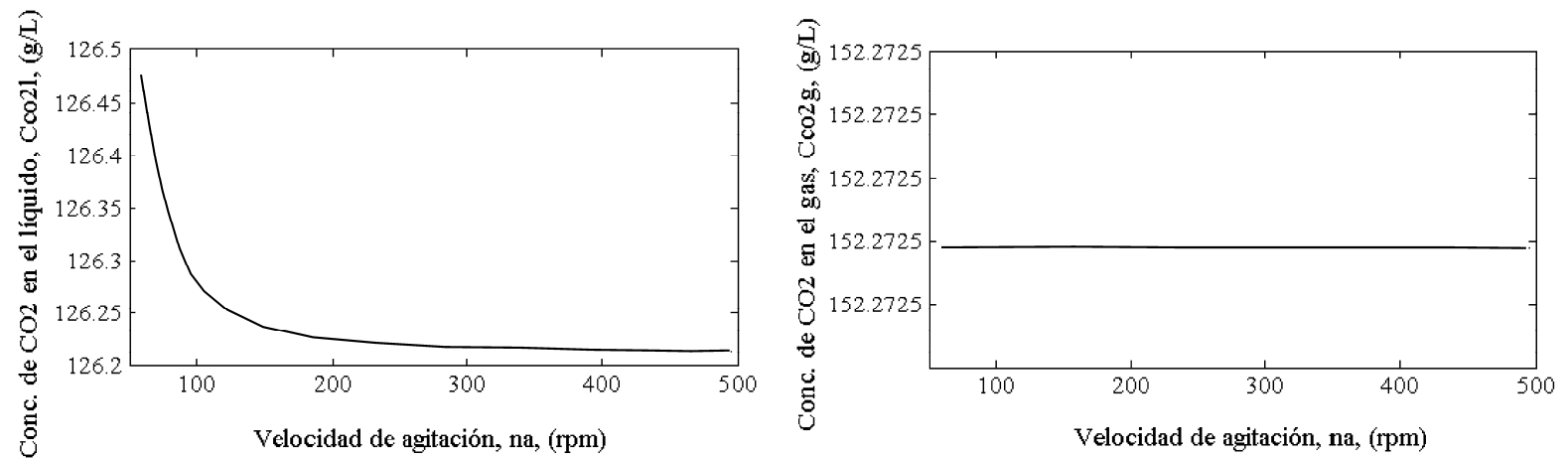


Figura 16. Diagrama de bifurcación para el sistema anaeróbico con agitación en la fermentación con *Saccharomyces cerevisiae*.

$F_g = 400$ L/h, $pH = 4$, $T = 32$ °C (— EE nodo estable).

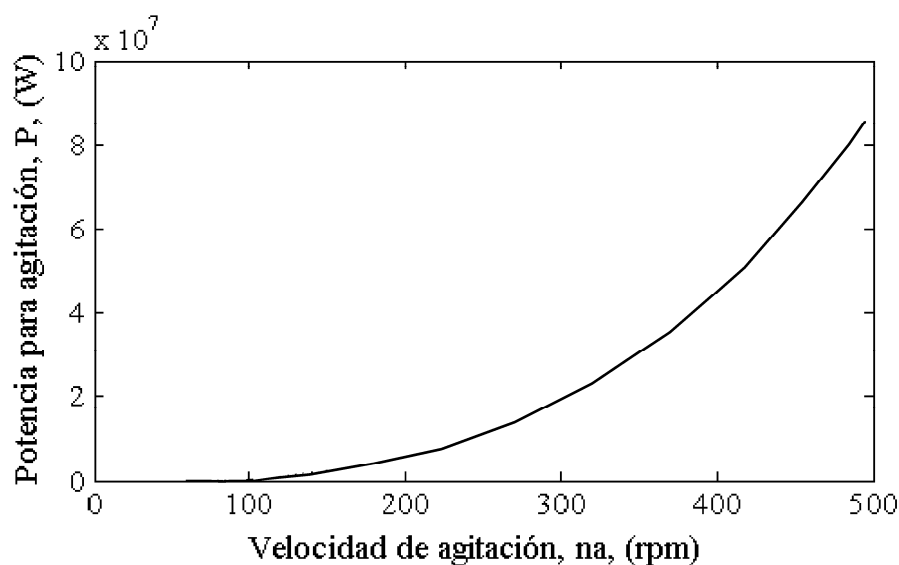


Figura 17. Consumo de potencia en función de la velocidad de agitación para la fermentación anaeróbica con *Saccharomyces cerevisiae*.
 $F_g = 400$ L/h, $pH = 4$, $T = 32$ °C (— EE nodo estable).

3.3.2.3 pH del Medio de Cultivo

La **Figura 18** corresponde al diagrama de bifurcación para C_{CO2l} y C_{CO2g} en función del pH del medio de cultivo. El diagrama se construyó para un rango de pH entre 3.5 y 6, y se consideró $F_g = 400$ L/h, $N_a = 150$ rpm, y $T = 32$ °C. Este diagrama confirma que el sistema exhibe un solo estado estacionario estable. También se observa que a pH inferiores a 4.5, no hay un efecto significativo sobre la concentración de dióxido de carbono en el líquido en estado estable. Sin embargo, para pH mayores a 4.5, la C_{CO2l} de estado estable sí disminuye notoriamente. Estos resultados indican que las fermentaciones de *Saccharomyces cerevisiae*, generalmente, se trabajan a pH donde se favorece la solubilidad del CO_2 en el agua, no obstante se sabe que propician un ambiente apropiado para el proceso de fermentación. Por lo tanto la selección del pH de operación, en este sistema, no depende de su efecto sobre la solubilidad del dióxido de carbono. Por esta razón, se recomienda trabajar a pH alrededor de 4 como lo especifica la literatura.

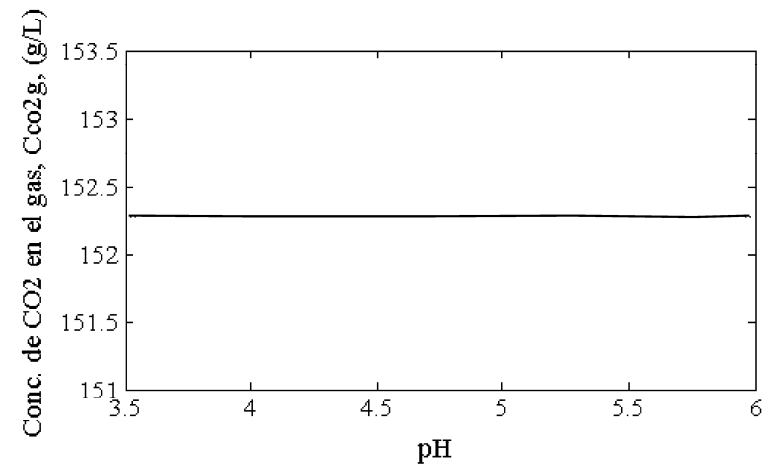
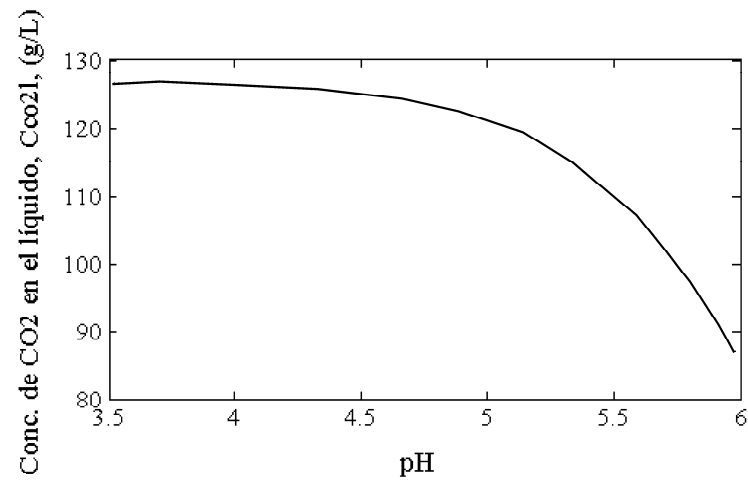


Figura 18. Diagrama de bifurcación para el sistema anaeróbico con agitación en la fermentación con *Saccharomyces cerevisiae*.

$Fg = 400$ L/h, $Na = 150$ rpm, $T = 32$ °C (— EE nodo estable).

3.3.2.4. Temperatura de Operación

La **Figura 19**, presenta el diagrama de bifurcación para las concentraciones de dióxido de carbono en las fases líquida y gaseosa, en función de la temperatura, para un rango entre 27 y 36 °C. Para la construcción del diagrama se fijaron $Fg = 400$ L/h, $Na = 150$ rpm, y $pH = 4$. Los diagramas indican que altas temperaturas promueven la retención del CO_2 en el líquido, y que bajas temperaturas favorecen su desorción; sin embargo, la variación entre las concentraciones no es significativa.

Al igual que el pH, la temperatura del caldo de cultivo es un parámetro cuya selección depende principalmente de los procesos de crecimiento microbiano y formación de producto. Por lo tanto, se recomienda operar las fermentaciones a temperaturas entre 28 y 35 °C, como lo establecen otros estudios.

En la **Tabla 14** se resumen las condiciones de operación establecidos a partir del análisis realizado para el sistema de fermentación anaeróbica con agitación.

Tabla 14. Condiciones de operación establecidas para el sistema de fermentación anaeróbica con agitación.

Velocidad de flujo volumétrica de la corriente de gas, Fg	Mayor o igual a 300 L/h
Velocidad de agitación, Na	Menor o igual a 150 rpm
Temperatura, T	28 – 35 °C
pH	3.5 - 6
Estado estacionario alcanzado	
Concentración de CO_2 en la fase líquida, C_{CO2l}	126.2 g/L
Concentración de CO_2 en la fase gaseosa, C_{CO2g}	152.2 g/L
Potencia de agitación máxima, P	2.4×10^6 W
Potencia específica de agitación máxima, Pe	240 KW/m ³

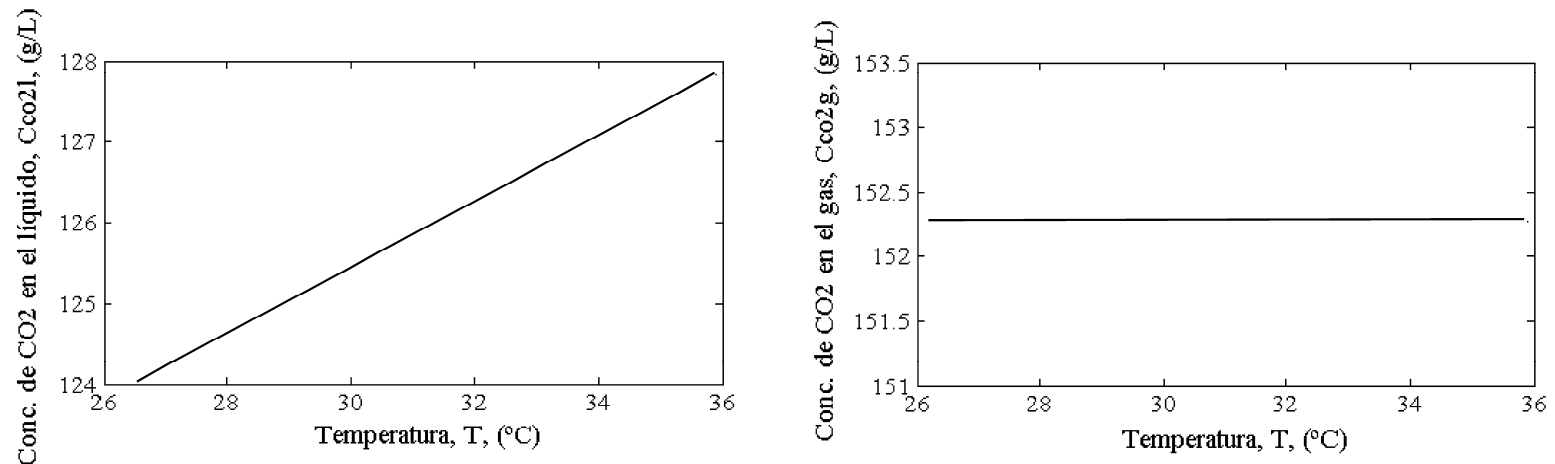


Figura 19. Diagrama de bifurcación para el sistema anaeróbico con agitación en la fermentación con *Saccharomyces cerevisiae*.

$F_g = 400$ L/h, $Na = 150$ rpm, $pH = 4$ (— EE nodo estable).

3.4 CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo coinciden con los resultados derivados de trabajos experimentales que se reportan en la literatura. Así, en un proceso continuo para producir etanol con *Zymomonas mobilis*, Bruce (Bruce et al., 1991) obtuvo una concentración de producto que oscilaba entre 30 y 50 g/L, cuando operó el sistema a una velocidad de dilución igual a 0.11 h^{-1} y una concentración de sustrato igual a 134 g/L. El estado alcanzado corresponde al único estado estacionario estable que puede lograr el sistema cuando opera bajo estas condiciones, como se predice en el diagrama de bifurcación de la **Figura 3**. En tal diagrama, a una velocidad de dilución de 0.1 h^{-1} y una concentración de sustrato en la alimentación de 134 g/L, se establece el alcance de un estado estacionario estable tipo foco con una concentración de etanol de 56 g/L.

Para el caso de producción de etanol con *Saccharomyces cerevisiae*, Perego (Perego Jr et al., 1985) determinó que el sistema puede alcanzar estados estacionarios estables con concentraciones de sustrato en la alimentación entre 100 y 145 g/L, y velocidades de dilución entre 0.05 y 0.16 h^{-1} . La concentración de etanol que se alcanza en estado estable está entre 29 y 51 g/L. Estos resultados muestran la misma tendencia a los determinados en el análisis realizado en este trabajo. Sin embargo, experimentalmente se observa el alcance de estados estables a una concentración de sustrato en la alimentación de 100 g/L y bajas velocidades de dilución, lo cual no fue lo predicho en el presente estudio. Esto es consecuencia del rango de los parámetros para el cual es válida la solución del modelo, la cual se ajusta más para altas velocidades de dilución. Es probable que la solución de un modelo que se ajuste a bajas velocidades de dilución sea capaz de predecir tales resultados experimentales.

En general, los diagramas de bifurcación obtenidos, permitieron tener un panorama del comportamiento de los estados estacionarios de cada sistema en función de la velocidad de dilución, y la concentración de sustrato en la alimentación. De esta manera fue posible establecer que estos dos parámetros tienen una fuerte incidencia en la estabilidad del

sistema. Se observó que en un estrecho rango de valores para estos parámetros, los sistemas presentan diferentes regiones de estabilidad, en las cuales se pueden presentar hasta cuatro estados estacionarios diferentes para un mismo valor de parámetro. Pequeñas variaciones en un parámetro de operación pueden provocar que el sistema no se estabilice o que alcance un estado estacionario de menor rendimiento al deseado, debido a las bifurcaciones que se presentan. Finalmente, a través de los diagramas de bifurcación fue posible definir rangos de valores para la velocidad de dilución y la concentración de sustrato en la alimentación donde se puede alcanzar un estado estacionario estable con buen rendimiento de producto.

Mediante la simulación dinámica de los procesos se verificó la respuesta del sistema cuando se opera a las condiciones preestablecidas con los diagramas de bifurcación. Igualmente, fue posible determinar condiciones iniciales para el proceso continuo que garantizan el alcance del estado estacionario de interés. De la misma forma, se pudo tener conocimiento aproximado de la trayectoria que sigue el proceso desde el arranque hasta el alcance del estado estable.

La simulación del proceso en el software *Aspen Custom Modeler* (ACM) permitió evaluar la respuesta dinámica del proceso cuando uno de los parámetros de operación sufre alguna perturbación durante o después del alcance del estado estacionario. Así, se pudieron determinar las condiciones bajo las cuales se puede mantener un estado estacionario, o en un caso dado, recuperar dicho estado. El modelamiento de procesos de fermentación en simuladores como el ACM permite proyectar el comportamiento de los bioprocesos a un nivel de planta, de manera que posteriormente se puede evaluar su desempeño real a escala industrial.

El análisis efectuado para evaluar el comportamiento del fenómeno de desorción de CO_2 en la fermentación con *Saccharomyces cerevisiae*, permitió establecer que para un rango de valores relativamente amplio de la velocidad de flujo volumétrico de gas, y de la velocidad de agitación, la concentración del dióxido de carbono en las fases líquida y gaseosa solo pueden lograr un único estado estacionario, el cual es estable. Igualess resultados se

obtuvieron para el rango establecido para la temperatura y el pH; sin embargo, no se puede generalizar las observaciones para el sistema de fermentación, ya que son parámetros que pueden afectar directamente el crecimiento de los microorganismos y la producción de etanol. El efecto global sobre los procesos de fermentación y transferencia de masa, solo se puede evaluar en la medida que se disponga de un modelo matemático que incluya el efecto de tales parámetros en las ecuaciones cinéticas. Finalmente, el análisis realizado permitió determinar valores para la velocidad de flujo volumétrico de gas y la velocidad de agitación, con los cuales se puede alcanzar un estado estacionario estable de baja concentración de CO₂ en la fase líquida, es decir con buena desorción del gas, garantizando un consumo de potencia para agitación moderado.

En conclusión, a partir de los análisis de estabilidad realizados para los sistemas de producción de etanol con *Zymomonas mobilis* y *Saccharomyces cerevisiae*, fue posible definir con un criterio técnico, condiciones de operación que garantizan, además del alcance y mantenimiento de estados estacionarios estables, un buen desempeño del proceso. Este tipo de análisis permite captar información de suma importancia para la operación de un proceso en planta, ya que revela el comportamiento del proceso, y permite trazar estrategias de operación y de acción, útiles para el control y la optimización de biorreactores a escala industrial.

REFERENCIAS

1. Bruce L.J., Axford D.B., Ciszek B., Daugulis A.J. (1991) Extractive fermentation by *Zymomonas mobilis* and the control of oscillatory behavior. *Biotechnology Letters* 13:291–296.
2. Doran P.M. (1998) *Principios de la Ingeniería de los Bioprocesos* Acribia, Zaragoza (España).

3. Galaction A.-I., Cascaval D., Oniscu C., Turnea M. (2004) Prediction of oxygen mass transfer coefficients in stirred bioreactors for bacteria, yeasts and fungus broths. *Biochemical Engineering Journal* 20:85-94.
4. Garhyan P., Elnashaie S.S.E.H. (2004) Utilization of mathematical models to investigate the bifurcation and chaotic behavior of ethanol fermentors. *Mathematical and Computer Modelling* 39:381-427.
5. Jarzebski A. (1992) Modelling of oscillatory behavior in continuous ethanol fermentation. *Biotechnology Letters* 14:137-142.
6. Jöbses I., Egberts G., Luyben K., Roels J. (1986) Fermentation kinetics of *Zymomonas mobilis* at high ethanol concentrations: oscillations in continuous cultures. *Biotechnology and Bioengineering* 28:868 – 877.
7. Mook W.G. (2000) Chemistry of carbonic acid in water, in: W. G. Mook (Ed.), *Environmental isotopes in the hydrological cycle. Principles and applications.*, Amsterdam.
8. Nielsen J., Villadsen J., Lidén G. (2004) *Bioreaction Engineering Principles*. 2nd ed. Kluwer Academic, China.
9. Perego Jr L., Cabral de S. Dias J.M., Koshimizu L.H., de Melo Cruz M.R., Borzani W., Vairo M.L. (1985) Influence of temperature, dilution rate and sugar concentration on the establishment of steady - state in continuous ethanol fermentation of molasses. *Biomass* 6:247-256.
10. Ribas M., Hurtado R., Garrido N., Díaz de los Ríos M., Doménech F., Sabadí R., García T., Rodríguez D. (2006) Modelación matemática y simulación de procesos fermentativos. *Ingeniería Química*:118-125.
11. Snoeyink V.L., Jenkins D. (1990) *Química del Agua LIMUSA*, México D.F. .

CAPÍTULO 4

ESTUDIO EXPERIMENTAL DEL EFECTO DE LA VELOCIDAD DE AGITACIÓN SOBRE VARIABLES DE INTERÉS EN LA FERMENTACIÓN CON *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

*“Exitoso es el hombre que puede construir buenos cimientos
con los ladrillos que otros le lanzan.”*

David Brinkley

En el Capítulo 3 de este trabajo se presentó un estudio teórico del efecto de la temperatura, el pH, la velocidad de agitación y la velocidad de flujo volumétrico de gas, sobre la concentración de dióxido de carbono en la fase líquida y en la fase gaseosa, en un sistema de fermentación anaeróbica con *Saccharomyces cerevisiae*. En este capítulo se confirma experimentalmente los resultados obtenidos en el estudio teórico, y se evalúa si pequeñas variaciones en la velocidad de agitación altera de forma significativa la tendencia del crecimiento celular.

4.1 MATERIALES Y MÉTODOS

4.1.1 Microorganismo

Se usó la levadura *Saccharomyces cerevisiae* que se cultiva en el laboratorio de Microbiología de la Planta Piloto de Biotecnología y Agroindustria de la Universidad

Nacional de Colombia Sede Manizales. La cepa fue aislada de una planta productora de etanol.

4.1.2 Medio de Cultivo

El medio de cultivo consistió de una solución de 60 Kg de melaza de caña en agua, con una concentración de 20°Brix de azúcar, 0.66 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.66 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 60.72 g de $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ y 127.32 g de $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$. El pH del medio se ajustó a 4 con una solución de H_2SO_4 .

Para crecimiento del preinóculo se tomó un volumen de 150 ml del medio de cultivo, y se hidrolizó a una temperatura de 80°C durante cuatro horas. Se cultivó una colonia de la cepa en el medio hidrolizado a una temperatura de 30°C, durante 24 horas. El medio para la fermentación se hidrolizó a una temperatura de 60°C, durante 24 horas. La inoculación al medio de fermentación se llevó a cabo a una temperatura controlada de 30°C.

4.1.3 Sistema

Se utilizó un fermentador de laboratorio de 3.7 L tipo *Ralf Plus SOLO* de la firma *Bioengineering*, dotado con el software de visualización *BioScadaLab*. El equipo cuenta con sistemas para sensar y manipular temperatura, pH, velocidad de agitación, oxígeno disuelto, dióxido de carbono disuelto, nivel de espuma y densidad óptica, y con módulos I/O y controladores lógicos programables (PLC), a los cuales se tiene acceso por una interfase de datos. El software tiene incorporado un programa *step sequence* para el control de toda la planta, y ofrece la facilidad de exportar los datos a Microsoft Excel.

La fermentación se desarrolló en modo discontinuo, sin aireación, en un volumen de operación de 2,5 L, durante 39 horas. El sistema se mantuvo a una temperatura constante de

30 °C, y se estableció una velocidad de agitación de 35 rpm. Se monitorearon tres variables, el pH, la presión parcial de oxígeno, pO_2 , y la presión parcial de dióxido de carbono, pCO_2 . Se tomaron muestras de 1 ml para determinar concentración de biomasa por conteo de células en cámara de Neubauer.

4.2 RESULTADOS

Las **Figuras 20 a 24** muestran el comportamiento de la temperatura, la velocidad de agitación, la presión parcial de O_2 , la presión parcial de CO_2 , y el pH durante la fermentación con *Saccharomyces cerevisiae*, respectivamente. La **Figura 25** presenta la tendencia de la concentración de biomasa a lo largo del proceso.

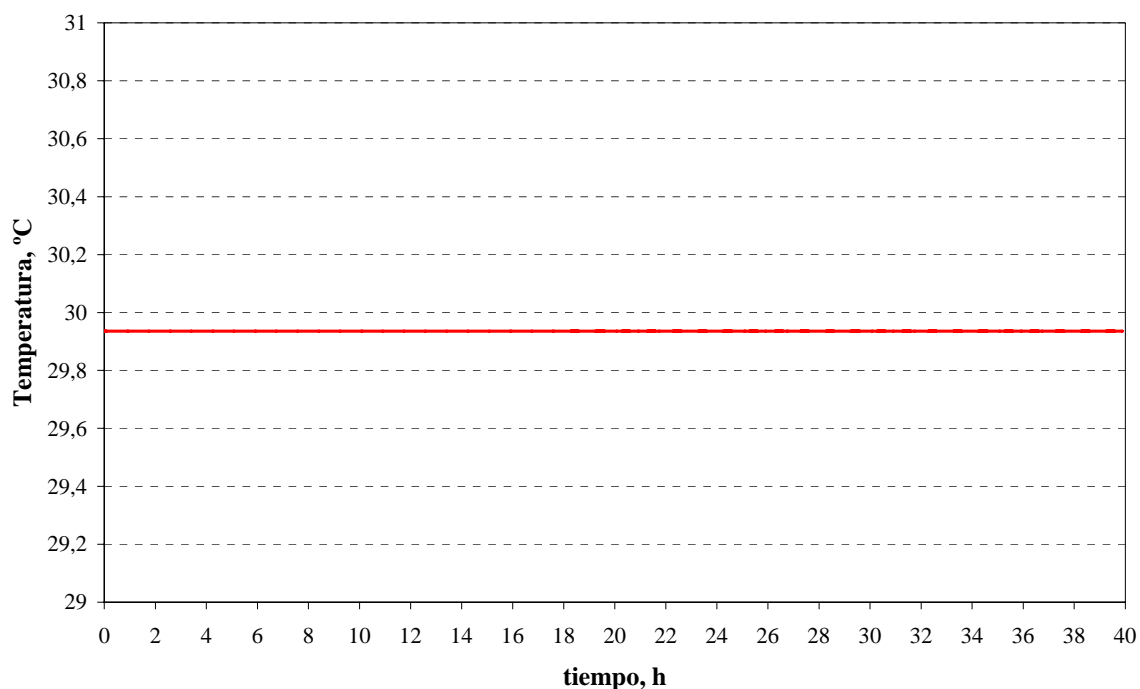


Figura 20. Comportamiento de la temperatura durante la fermentación con *Saccharomyces cerevisiae*.

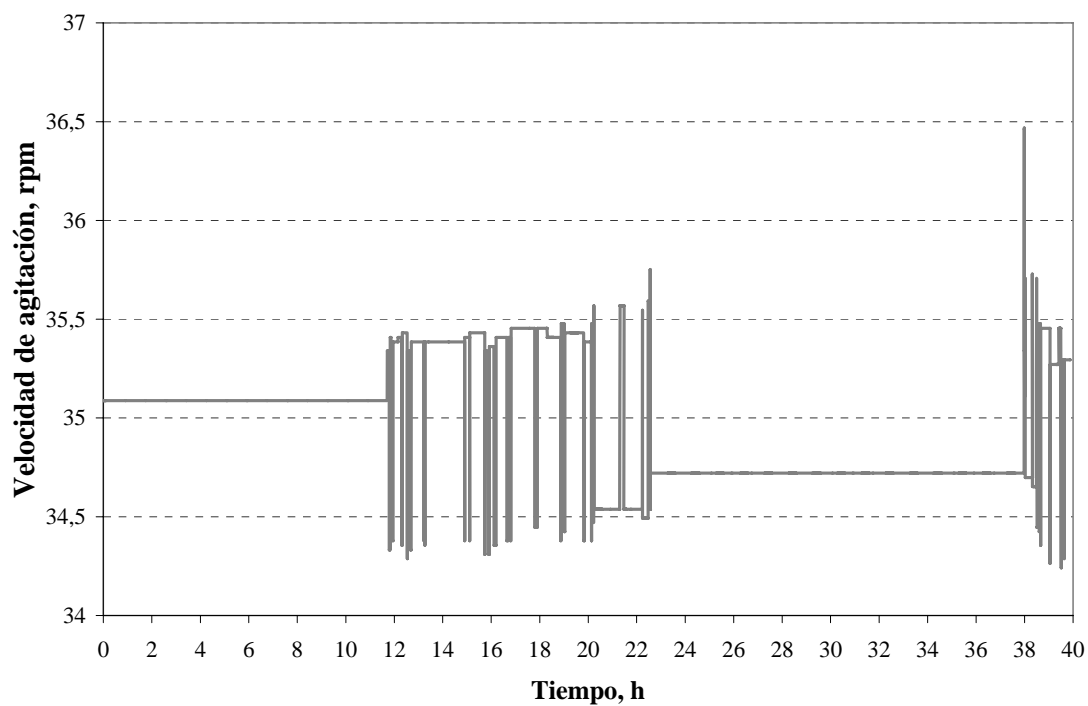


Figura 21. Comportamiento de la velocidad de agitación durante la fermentación con *Saccharomyces cerevisiae*.

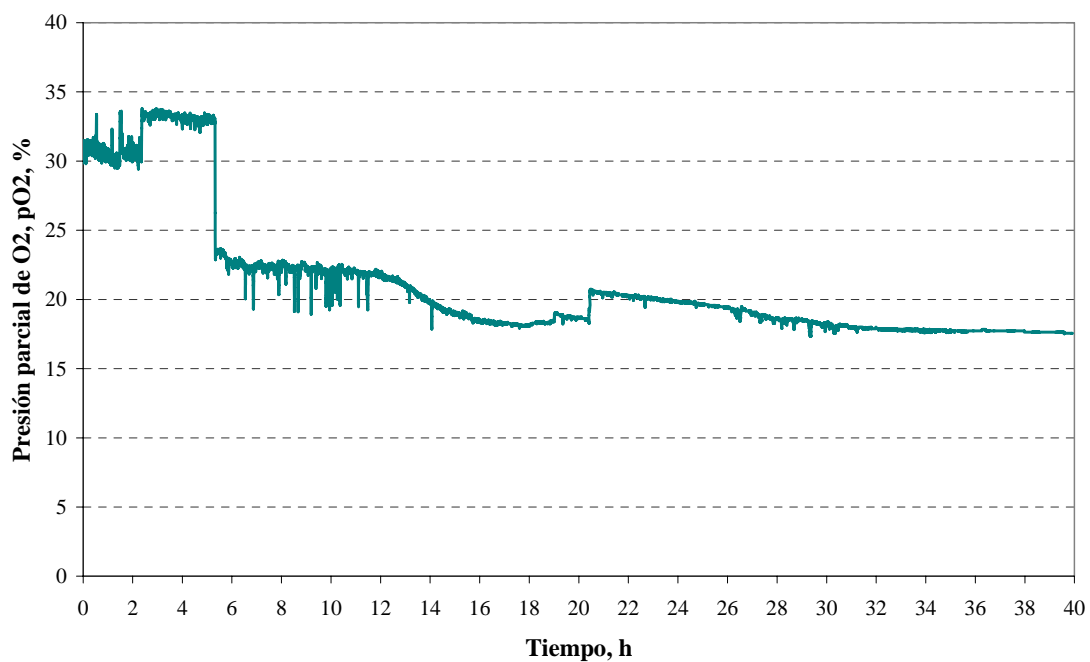


Figura 22. Comportamiento de la presión parcial de oxígeno durante fermentación con *Saccharomyces cerevisiae*.

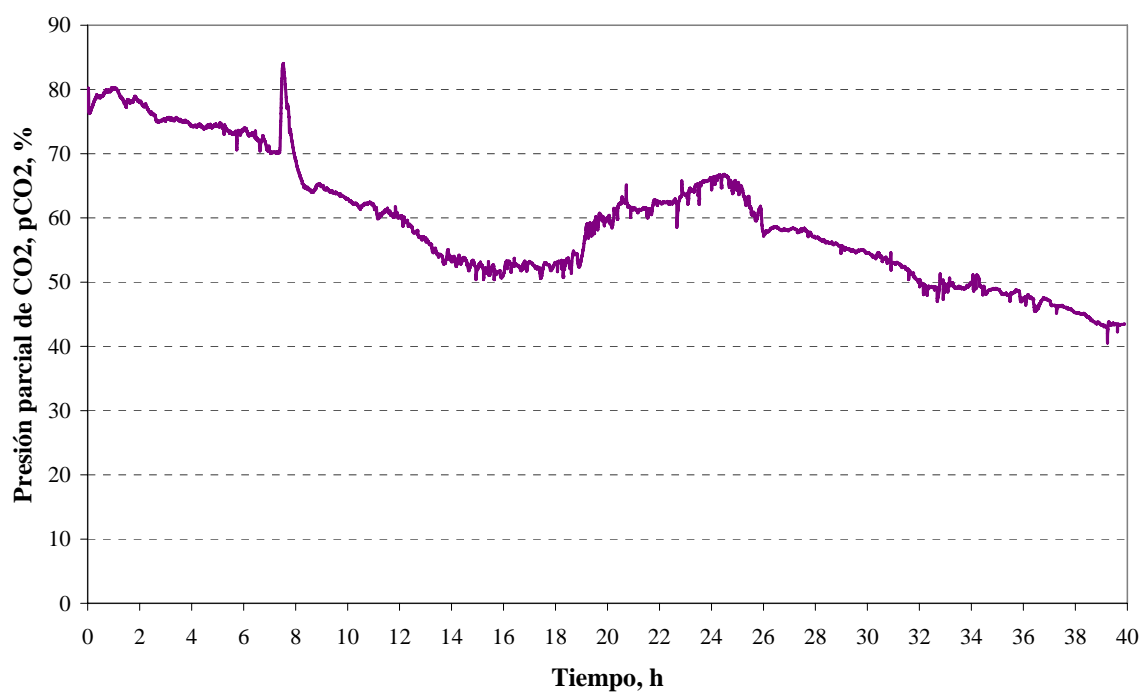


Figura 23. Comportamiento de la presión parcial de dióxido de carbono durante la fermentación con *Saccharomyces cerevisiae*.

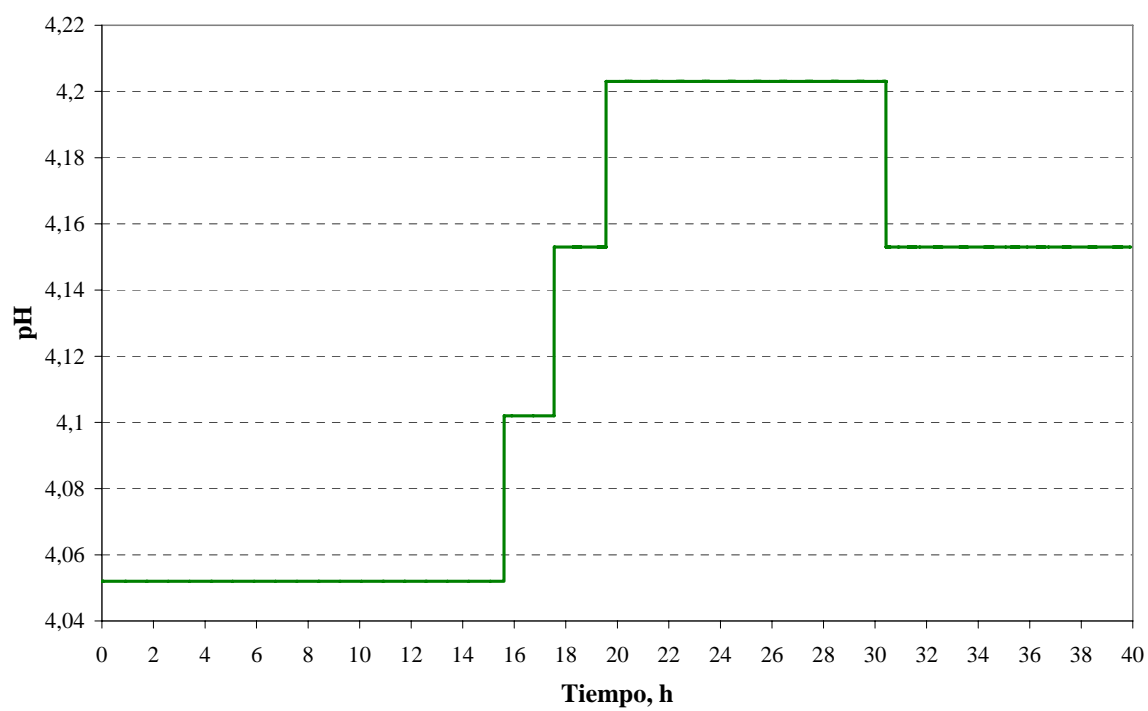


Figura 24. Comportamiento del pH durante la fermentación con *Saccharomyces cerevisiae*.

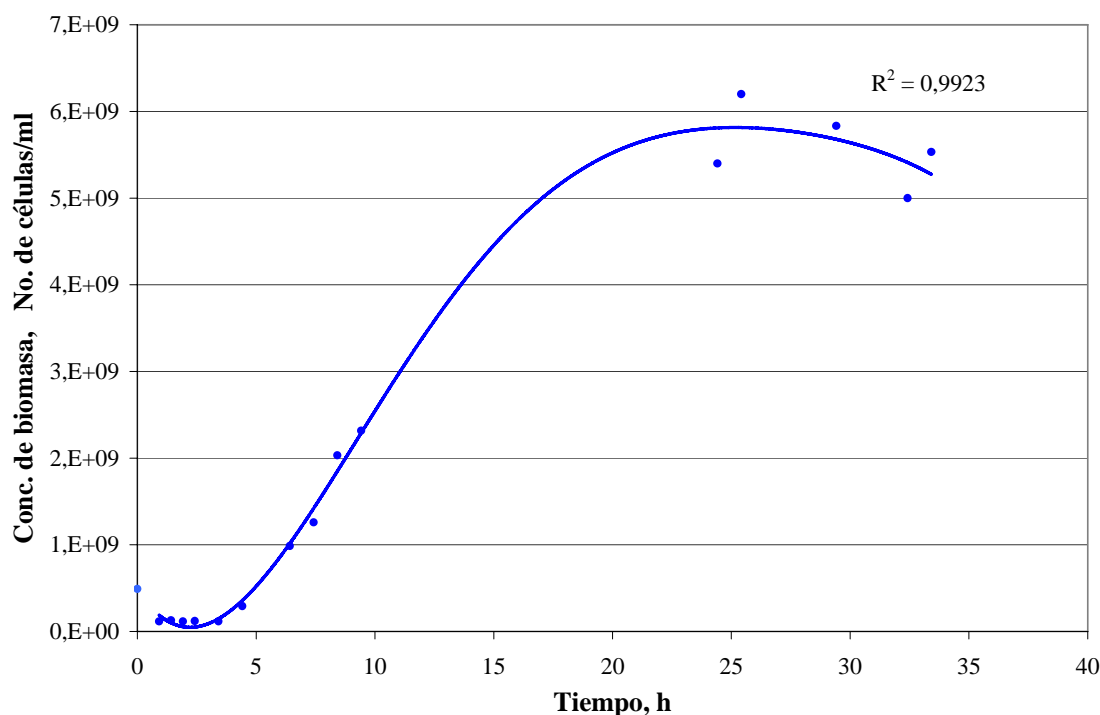


Figura 25. Tendencia de la concentración de biomasa durante la fermentación con *Saccharomyces cerevisiae*.

4.3 ANÁLISIS DE RESULTADOS

Como se observa en la **Figura 20**, la temperatura del sistema se mantuvo constante en un valor de 29.9 °C durante todo el proceso de fermentación. Por otro lado, aunque la velocidad de agitación inicial se estableció en 35 rpm, después de transcurridas 11 horas de la fermentación, este parámetro de operación se perturbó de forma irregular, tomando valores entre 34 y 36 rpm, por un período de 10 horas. Lo anterior se muestra en la **Figura 21**.

Según la **Figura 22**, la concentración de oxígeno disuelto en el líquido, como es de esperarse, tiende a disminuir durante todo el proceso de fermentación, debido al consumo de las células para el crecimiento. Así mismo, se observa una repentina caída en la

concentración de O_2 que coincide con el inicio de la fase exponencial a las 5 horas de iniciado el proceso, como se aprecia en la **Figura 25**.

Así mismo, como se observa en la **Figura 23**, la cantidad de dióxido de carbono disuelto en el agua también muestra una tendencia general a disminuir pese a que es un compuesto que se produce y no que se consume. Esto se debe a que la agitación y el sistema de purga de gases promueven la desorción del CO_2 del medio líquido y su evacuación en fase gaseosa, disminuyendo así la presión del gas sobre la capa de líquido y por lo tanto la presión de saturación en la fase líquida.

Un repentino incremento en la cantidad de dióxido de carbono en el líquido se presenta después de 7.5 horas de iniciada la fermentación, es decir aproximadamente 2 horas después de presentarse la repentina disminución en la concentración de O_2 en el líquido. La razón de este fenómeno es probablemente el resultado del metabolismo oxidativo de las células, que al consumir una alta cantidad de oxígeno, producen altas cantidades de dióxido de carbono.

En la **Figura 23** se observa que, cuando la velocidad de agitación aumenta, la cantidad de CO_2 en el gas disminuye más de lo normal. También se aprecia que durante las variaciones en la agitación, la cantidad de CO_2 en el líquido refleja los picos del parámetro perturbado. Lo anterior indica que esta variable es muy sensible al parámetro modificado.

Por otro lado, como se observa en la **Figura 22**, cuando la velocidad de agitación se perturba, la cantidad de oxígeno disuelto parece homogenizarse en el medio, y por lo tanto se percibe menos ruido en las medidas registradas. Esto indica que la cantidad de oxígeno disuelto es más estable que la cantidad de CO_2 disuelto en el medio de cultivo. Por lo tanto, se considera que es más fácil desorber el dióxido de carbono que el oxígeno.

Según se ha visto en otros trabajos del grupo de investigación (Mariscal, 2010), el pH de medios preparados a partir de la melaza utilizada como materia prima para esta

fermentación, no varía significativamente debido a los múltiples electrolitos que contiene el material, los cuales actúan como reguladores del pH. No obstante, para la fermentación realizada, la disminución de la concentración de dióxido de carbono disuelto en el medio, provoca una reducción de la concentración de iones hidronios en el líquido, lo cual se refleja en un aumento en el pH del caldo de fermentación. Después de que cesa la variación de la velocidad de agitación, el pH vuelve a un valor constante, pero no recupera el valor inicial. Todo lo anterior se puede verificar en la **Figura 24**.

La **Figura 25** muestra la tendencia del crecimiento de la levadura. Se observa una fase de latencia de 5 horas, una fase exponencial de aproximadamente de 20 horas, una corta fase estacionaria, y probablemente el comienzo de la fase de muerte debido al agotamiento de los azúcares. Medidas de la concentración de células se tomaron justo antes y después de la perturbación en la velocidad de agitación, encontrando que la tendencia del crecimiento celular no se ve alterada con los cambios de dicho parámetro de operación, ni con las consecuentes variaciones en las concentraciones de O_2 y de CO_2 en el medio de cultivo, ni del pH.

4.4 CONCLUSIONES

Según los resultados obtenidos se puede concluir que la velocidad de dilución afecta la concentración de dióxido de carbono en la fase líquida de la forma como se había predicho en el estudio teórico. De manera que, un incremento en la velocidad de agitación, favorece la desorción del dióxido de carbono, y por lo tanto disminuye su concentración en la fase líquida. Así mismo, se concluye que como la concentración de CO_2 está relacionada de forma inversa el pH, variaciones prolongadas en la velocidad de agitación pueden alterar de forma significativa el pH del medio de cultivo. Pequeñas perturbaciones en la velocidad de agitación no tienen gran incidencia sobre el crecimiento microbiano. Sin embargo, operar el biorreactor fuera del rango óptimo de pH, puede hacer que caigan los rendimientos de biomasa y producto.

En un sistema anaeróbico, donde no hay ingreso de una corriente de gas con oxígeno, la concentración de este compuesto no es muy sensible a la velocidad de agitación. Razón por la cual, es probable que no haya cambios en la tendencia del crecimiento microbiano. En fermentaciones anaeróbicas, el diseño del sistema de fermentación debe estar determinado por la capacidad de desorber el CO₂ y de homogenizar el medio.

El desarrollo de pruebas experimentales, donde se evalúe de forma controlada el efecto de estas variables mecánicas sobre el crecimiento de los microorganismos y la formación de producto, permitiría definir en forma definitiva, si la concentración de dióxido de carbono en la fase líquida tiene o no tiene un efecto adverso sobre el proceso de fermentación. Así mismo, se podría establecer si existe una relación directa entre los parámetros mecánicos relacionados con el fenómeno de transferencia de masa y los parámetros cinéticos.

REFERENCIAS

1. Mariscal J.P. (2010) Selección de Microorganismos para la producción de Etanol a Nivel Industrial (en evaluación), Maestría en Ingeniería Química, Universidad Nacional de Colombia Sede Manizales, Manizales.

CAPÍTULO 5

EVALUACIÓN EXPERIMENTAL DE LA FERMENTACIÓN DE SACAROSA SIN HIDROLIZAR

*“La vida no consiste en tener buenas cartas,
sino en saber jugar bien las que se tiene.”*

John Billings

La mayoría de las plantas productoras de etanol utilizan como materias primas el jugo de la caña de azúcar y la melaza, las cuales tienen un alto contenido de sacarosa, 72 a 95% en peso en el jugo de caña (Chaves, 2004), y 60 a 63% en la melaza (Fajardo and Sarmiento, 2007). La levadura *Saccharomyces cerevisiae* tiene la capacidad de desdoblar la sacarosa en glucosa y fructosa para vivir y producir etanol, sin embargo, el proceso es muy lento, lo cual afecta la productividad de la fermentación. Por lo tanto, las materias primas deben someterse a un tratamiento previo para la hidrólisis de la sacarosa.

Se han identificado dos vías para realizar este tratamiento:

- Vía química, en presencia de un ácido (pH alrededor de 4), a temperaturas entre 75 y 80°C, y por un período de 2 horas aproximadamente.
- Vía bioquímica, en presencia de una enzima (invertasa), a una temperatura de 40°C, y durante 24 horas aproximadamente.

Los altos costos del proceso de producción de la invertasa, junto con el bajo rendimiento en la extracción del proceso, y su purificación, han sido factores limitantes para el uso de la

hidrólisis enzimática en procesos industriales. Por esta razón, el proceso de hidrólisis ácida aún se prefiere en la mayoría de las plantas productoras de etanol. Sin embargo, debido a las condiciones extremas de la hidrólisis ácida, durante este proceso se forman subproductos, tales como el hidrometil furfural (Santana et al., 2005).

Estas sustancias, hacen parte de la corriente de alimentación a la etapa de fermentación, y suelen convertirse en toxinas o sustancias inhibitorias que causan stress en las células (Garay-Arroyo et al., 2004; Zhao and Bai, 2009), y pueden afectar la estabilidad del sistema.

Por lo tanto, es importante estudiar el efecto de los subproductos provenientes de los procesos de pretratamiento de las materias primas sobre la estabilidad del proceso de fermentación. Una investigación con este objetivo, debe tener como punto de comparación, el comportamiento del sistema cuando parte de una materia prima sin subproductos. Entonces, en primera instancia, se podría evaluar la estabilidad del sistema cuando se parte de sacarosa sin hidrolizar.

Debido a que se conoce que el proceso de desdoblamiento de la sacarosa, que lleva a cabo la levadura, es lento, en este trabajo se exploró si el pH del medio de fermentación acelera o retrasa la formación de biomasa y etanol a partir de sacarosa. De esta manera se evaluó si se justifica realizar un estudio experimental, para análisis de estabilidad, partiendo de sacarosa sin pretratamiento.

5.1 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1.1 Microorganismo

Se usó la levadura *Saccharomyces cerevisiae* que se cultiva en el laboratorio de Microbiología de la Planta Piloto de Biotecnología y Agroindustria de la Universidad

Nacional de Colombia Sede Manizales. La cepa fue aislada de una planta productora de etanol.

5.1.2 Medio de cultivo

El medio de crecimiento para el inóculo consistió de 80 g/L de sacarosa, 0.00125 g/L de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.00125 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.108 g/L de $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0.226 g/L de $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$, y 1 colonia de la cepa. El medio de producción se preparó con la misma concentración de sustrato y de nutrientes. Se le adicionó 30 ml del preinóculo. La esterilización se hizo a 121 °C durante 20 minutos. El pH del medio se ajustó con una solución de H_2SO_4 0.2N.

5.1.3 Sistema

Después de la inoculación, la fermentación se desarrolló en modo discontinuo, en frascos con un volumen de operación de 290 ml, durante 74 horas. El sistema se mantuvo a una temperatura constante de 30 °C, y una agitación de 100 rpm, en un *shaker*. Se monitoreó el pH del medio, y se tomaron muestras de 1 ml para determinación de concentración de biomasa y etanol.

5.1.4 Métodos Analíticos

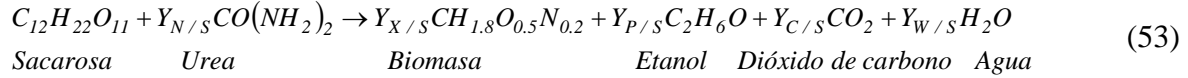
La concentración de células fue determinada por absorbancia leída en un espectrofotómetro *Thermo Scientific Genesys20* (precisión: $\pm 0.003A$ desde 0 hasta 0.3 A), a una longitud de onda de 620 nm. Se realizó una curva de calibración de peso seco vs. absorbancia, determinándose que la concentración de biomasa en g/ml obedece a la relación $Cx = 0.0949 A - 9e^{-5}$. La concentración final de etanol fue determinada en un cromatógrafo de

gases *Autosystem XL* de *Perkin Elmer*, con una columna PE-624, detector FID y gas de arrastre helio.

5.2 RESULTADOS

Se desarrollaron fermentaciones a cuatro pH iniciales diferentes dentro de un rango tolerable para el microorganismo: 3.9, 4.5, 5.4 y 5.6.

Las **Figuras 26 y 27** muestran el seguimiento de la concentración de biomasa y del pH en el tiempo, para las cuatro fermentaciones. En la **Tabla 15** se resumen los resultados obtenidos para todas las fermentaciones. La concentración de sacarosa consumida se calculó teóricamente, con base en un balance de masa según la reacción expresada en la Ecuación 53.



La conversión de sustrato, el rendimiento de biomasa por sustrato, y el rendimiento de producto por sustrato se calcularon con las relaciones expresadas en las Ecuaciones 54, 55 y 56 respectivamente.

$$X = \frac{\Delta C_s}{C_{s_o}} \quad (54)$$

$$Y_{X/S} = \frac{\Delta C_x}{\Delta C_s} \quad (55)$$

$$Y_{P/S} = \frac{\Delta C_p}{\Delta C_s} \quad (56)$$

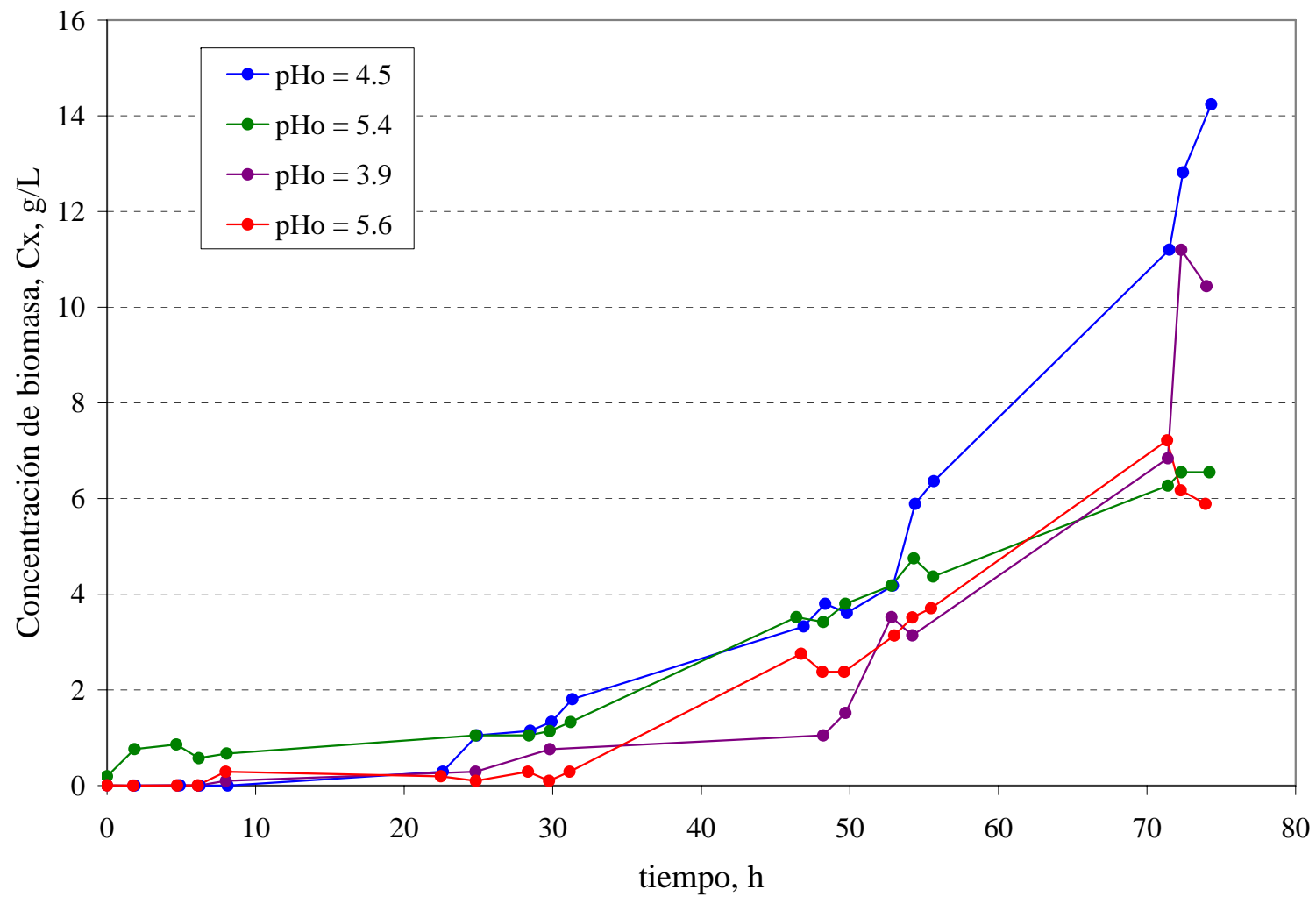


Figura 26. Evolución de la concentración de biomasa en el tiempo.

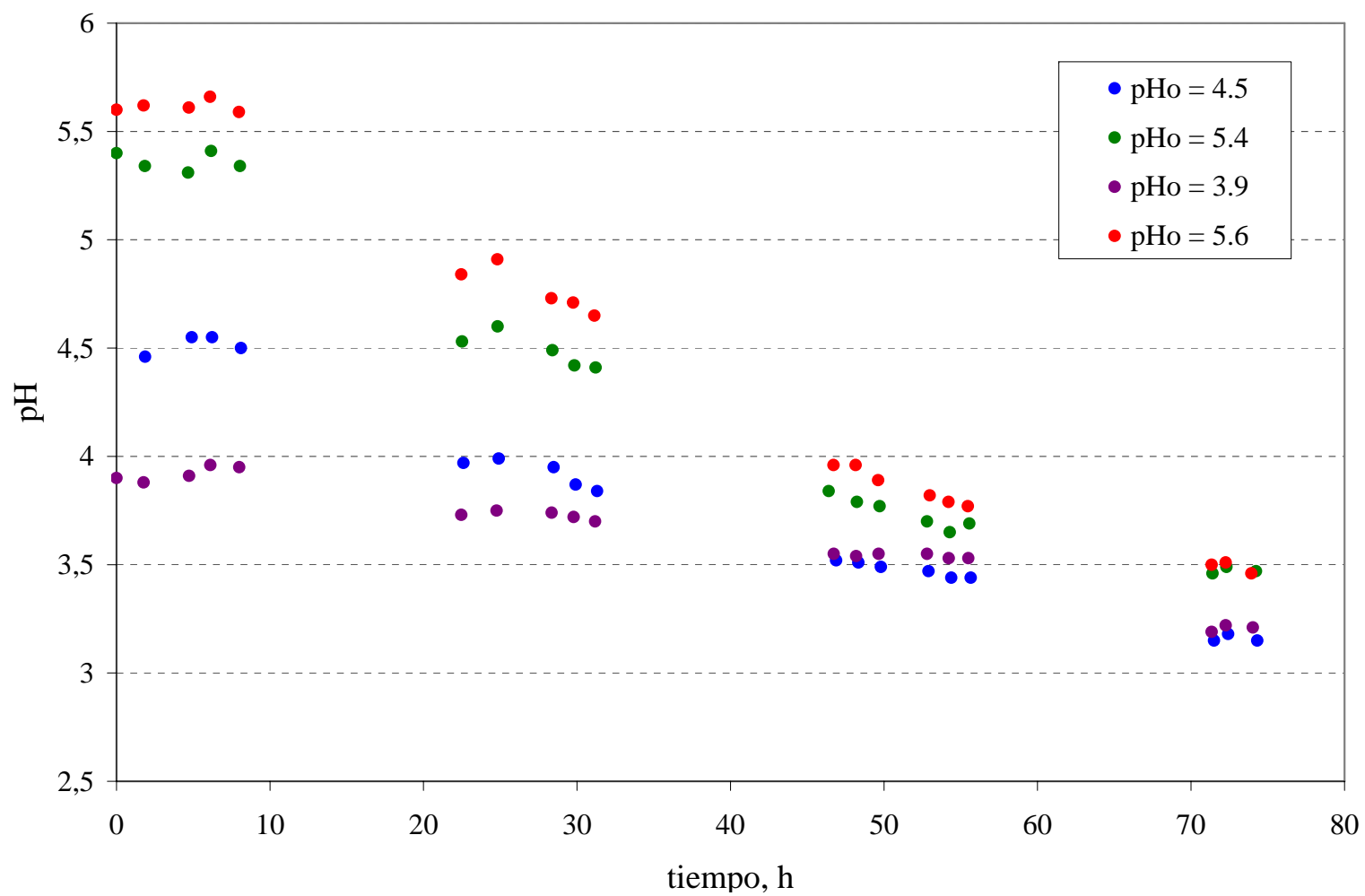


Figura 27. Evolución del pH en el tiempo.

Tabla 15. Resultados de proceso de hidrólisis-fermentación a diferentes pH.

	pH _o			
	3.9	4.5	5.4	5.6
Concentración final de biomasa, C_x , g/L	10.44	14.24	6.55	6.17
Concentración final de etanol, C_p , g/L	0.48	0.94	0.76	0.97
Concentración final de sustrato, C_s , g/L	66.41	62.44	70.85	70.69
Conversión, X	0.17	0.22	0.11	0.12
Rendimiento de biomasa por sustrato, $Y_{x/s}$, g/g	0.77	0.74	0.70	0.66
Rendimiento de producto por sustrato, $Y_{p/s}$, g/g	0.04	0.05	0.08	0.1

5.3 ANÁLISIS DE RESULTADOS

En la **Figura 26**, se observa que el microorganismo tiene una fase de latencia, común para los cuatro pH, de aproximadamente 30 horas. Al cabo de 72 horas se ha convertido máximo el 20% del sustrato. Esto confirma que el proceso de fermentación de sacarosa sin hidrolizar, bajo las condiciones establecidas, es muy lento. Lo anterior indica que variaciones del pH del caldo de cultivo, dentro del rango establecido, no tiene ningún efecto acelerador significativo del proceso hidrólisis – fermentación.

Por otro lado, al observar la **Figuras 26 y 27** simultáneamente, también se aprecia, que cuando el sistema alcanza pH inferiores a 3.5 se dispara la formación de biomasa. Los resultados de la **Tabla 15** muestran que a bajos pH se favorece el rendimiento de biomasa, pero el rendimiento de producto disminuye. Esto indica que el pH sí tiene un efecto sobre los rendimientos finales del proceso, no obstante es necesario realiza más ensayos para la significancia de tal efecto.

5.4 CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos indicaron que no se justifica realizar un estudio experimental, para análisis de estabilidad, partiendo de sacarosa sin pretratamiento, porque el proceso hidrólisis – fermentación realizado solo por la levadura es muy lento. Para fines prácticos, sería más aconsejable iniciar el proceso con una mezcla de glucosa y fructosa.

En este capítulo se dejan abiertos dos problemas para abordar en otros trabajos de investigación:

1. Determinar el efecto de los subproductos, provenientes de los procesos de pretratamiento de las materias primas, sobre la estabilidad del proceso de fermentación, tanto para materias primas ricas en sacarosa, como para materias primas amiláceas y lignocelulósicas. Lo anterior es importante, debido al creciente interés en utilizar estos dos últimos tipos de materia prima para la producción de alcohol carburante. Para el diseño de procesos a partir de estas materias primas, debe considerarse que su compleja composición, y los agresivos procesos de pretratamiento a los que se someten, conducen a la formación de una variedad de subproductos que suelen ser tóxicos para los microorganismos que fermentan.
2. Analizar el efecto del pH del caldo de cultivo para diferentes sustratos complejos sobre los rendimientos de formación de biomasa y de producto. Esto es útil para el caso de plantas productoras de etanol, que intercalan el uso de jugo de caña y de melaza durante su operación. Estas materias primas, aunque tienen la misma azúcar base, tienen composición diferente, la cual, al interactuar con la acidez del medio pueden afectar los rendimientos de la producción. Es importante estandarizar condiciones de operación, por ejemplo de pH, para cuando se usan materias primas con diferentes composiciones, con el fin de no tener variaciones inesperadas en la productividad de la fermentación.

REFERENCIAS

1. Chaves M. (2004) La caña de azúcar como materia prima para la producción de alcohol carburante, Antecedentes y Capacidad Potencial de Cogenerar Energía y Producir Etanol por Parte del Sector Azucarero Costarricense, San José, Costa Rica.
2. Fajardo E., Sarmiento S. (2007) Evaluación de la melaza de caña como sustrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae*, Facultad de Ciencias Básicas, Pontificia Universidad Javeriana. Microbiología Industrial, Bogotá.
3. Garay-Arroyo A., Covarrubias A.A., Clark I., Niño I., Gosset G., Martínez A. (2004) Response to different environmental stress conditions of industrial and laboratory *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Applied Microbiology and Biotechnology* 63:734-741.
4. Santana A.C., Costa L., Mendes A., Moraes C.A., Gomes M.A., Perez M.-A. (2005) Sucrose hydrolysis catalyzed by auto-immobilized invertase into intact cells of *Cladosporium cladosporioides*, *Electronic Journal of Biotechnology*.
5. Zhao X.Q., Bai F.W. (2009) Mechanisms of yeast stress tolerance and its manipulation for efficient fuel ethanol production. *Journal of Biotechnology* 144:23-30.

CAPÍTULO 6

ESTRATEGIA INTEGRAL DE DISEÑO DE BIORREACTORES CONTINUOS

“Una vela no pierde nada cuando enciende otra vela”.

Thomas Jefferson

En este capítulo un proceso de fermentación para producción de etanol con *Saccharomyces cerevisiae* se diseña utilizando el método convencional de diseño de biorreactores. Las condiciones de operación determinadas se comparan con las establecidas en el capítulo anterior para el mismo sistema. La productividad, el consumo de energía por agitación, el consumo de fluido de servicio para transferencia de calor, y el impacto ambiental potencial se utilizan como criterio para establecer el diseño que garantiza el mejor desempeño del proceso.

Finalmente, se presenta una estrategia integral de diseño de biorreactores continuos para la producción de etanol. Esta estrategia incluye una modificación del método convencional de diseño de biorreactores continuos de tanque agitado, en el cual las condiciones de operación se determinan con base en el análisis de estabilidad del biosistema.

6.1 MÉTODO CONVENCIONAL DE DISEÑO DE BIORREACTORES CONTINUOS DE TANQUE AGITADO

El método convencional de diseño de biorreactores, principalmente, se ha fundamentado en cálculos estequiométricos, en pruebas experimentales previas, y en modelos cinéticos analizados en estado estable. De esta manera, la velocidad de flujo de entrada, y la concentración de sustrato alimentada, se especifican sin tener en cuenta el comportamiento dinámico del sistema. Así mismo, las condiciones de arranque se definen sin un criterio fijo y claro. Posteriormente, bajo estas circunstancias, se calcula el volumen de trabajo, y los parámetros de operación para proveer la transferencia de calor y la transferencia de masa requeridas para que el sistema cumpla con los requerimientos de producción establecidos previamente.

Como consecuencia de lo anterior, cuando el diseño realizado se implementa en planta, se observan cambios inesperados en el rendimiento del producto, desperdicio de energía y emisiones extra de residuos. Entonces, los parámetros de operación se suelen modificar de forma aislada con el fin de mejorar los resultados. Esto conlleva a desgastantes y costosas jornadas de ensayos, que no favorecen la productividad del proceso global, hasta el punto de hacer parecer que el proceso no es viable económicamente. La **Figura 28** presenta un esquema general del método convencional de diseño de biorreactores.

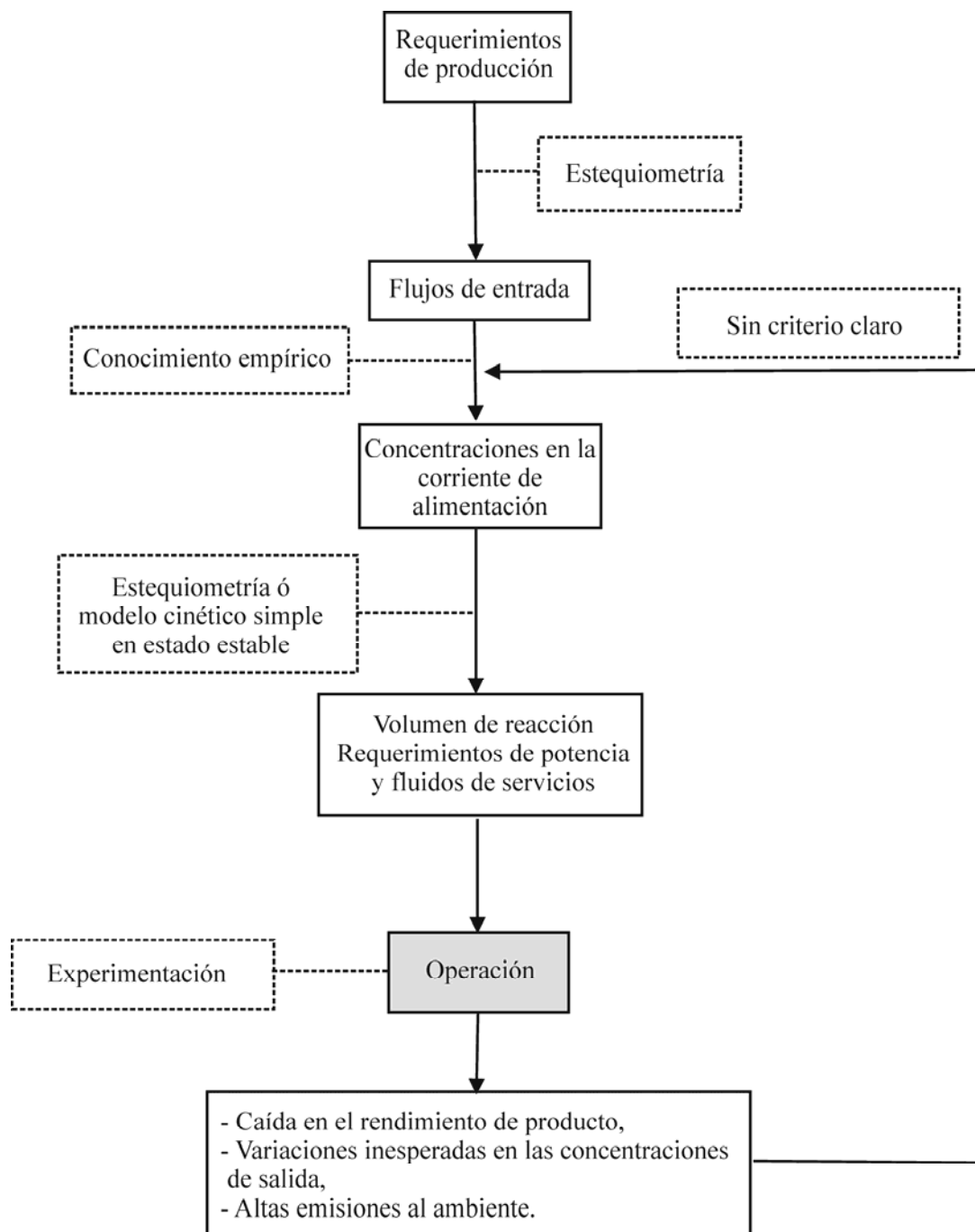
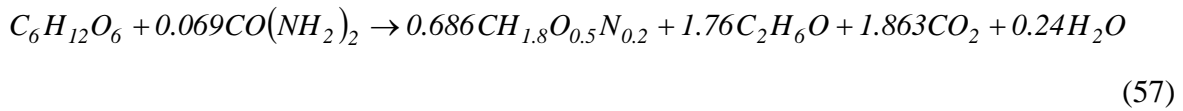


Figura 28. Esquema del método de diseño convencional de biorreactores continuos de tanque agitado.

6.1.1 Diseño de un Biorreactor para Producción de Etanol con el Método Convencional

Un biorreactor de tanque agitado continuo para producir etanol con *Saccharomyces cerevisiae* se diseña usando el método convencional. Se establece como requisito una producción diaria de 22.5 m³ de etanol. Los requerimientos de materia prima se calculan por estequiometría según la Ecuación 57. Se asume que el rendimiento de producto es 0.45 g etanol /g glucosa tomando en cuenta que el rendimiento de producto en la industria varía entre un 87 y un 93 % del rendimiento teórico (Vázquez and Dacosta, 2007). Se escoge una concentración de sustrato alimentado igual a 100 Kg/m³ con el objeto de evitar inhibición por sustrato (Lenbury et al., 1999).



Para efectuar el diseño se usa el software *SuperPro Designer*. Se adopta la cinética descrita en la Ecuación 58 (Ribas et al., 2006) donde la velocidad de crecimiento está dada por la ecuación de Monod (Ecuación 59). En la **Tabla 16** se consignan las constantes requeridas para el modelo. Para el proceso se define un consumo específico de potencia de 240 KW/m³, el cual es igual al establecido para este mismo sistema en el análisis de estabilidad del Capítulo 3.

$$Rs = \left(\frac{2}{Y_{xs}} \mu - m \right) C_x \quad (58)$$

$$\mu = \mu_{max} \frac{Cs}{Ks + Cs} \quad (59)$$

Donde μ es la velocidad específica de crecimiento celular en h^{-1} , μ_{max} es la velocidad específica máxima de crecimiento celular en h^{-1} , C_s es la concentración de sustrato en g/L, C_x es la concentración de células en g/L, K_s es la concentración de sustrato de saturación para crecimiento en g/L, m es el coeficiente de mantenimiento celular en h^{-1} , R_s es la velocidad de consumo de sustrato en g/L h, y Y_{xs} es el coeficiente estequiométrico que relaciona células con sustrato consumido en g células/g sustrato.

Tabla 16. Constantes del modelo cinético para el diseño por el método convencional.

Constante	Valor
K_s	0,315 g/L
m	0,001 h^{-1}
Y_{xs}	0,33 g células/g sustrato
μ_{max}	0,3 h^{-1}

Al software se le definen el flujo de materiales en la corriente de entrada, la temperatura y la presión de operación, la potencia específica de agitación, el agente de transferencia de calor, y el modelo cinético. El software entrega como resultado el flujo de producto y de subproductos en las corrientes de salida, el volumen de operación, el tiempo de residencia, el consumo total de potencia y el flujo del fluido de transferencia de calor. En la **Tabla 17** se resumen los resultados obtenidos.

Tabla 17. Condiciones del proceso de fermentación con *Saccharomyces cerevisiae* diseñado con el método convencional.

Requerimiento de producción, m³/día	22,5
Flujo másico de etanol a la salida del biorreactor, Kg/h	843,75
Entrada	
Flujo másico de glucosa, Kg/h	2250
Flujo másico de urea, Kg/h	51,8
Flujo másico de agua, Kg/h	20.420
Flujo volumétrico, m ³ /h	22,53
Temperatura, °C	28
Presión, atm	1
Salidas	
Flujo másico de etanol, Kg/h	851,86
Flujo másico de levadura, Kg/h	198,55
Flujo másico de glucosa, Kg/h	357,34
Flujo másico de urea, Kg/h	7,63
Flujo másico de agua, Kg/h	20.466,41
Flujo volumétrico, m ³ /h	22,2
Temperatura, °C	30
Presión, atm	1
Flujo másico de dióxido de carbono, Kg/h	860,01
Tiempo residencia, h	5,3449
Velocidad de dilución, h ⁻¹	0,187
Volumen de trabajo, m ³	120,44
Temperatura de operación, °C	30
Agente de transferencia de calor	Agua refrigerada
Calor transferido por enfriamiento, Kcal/h	24'827.747
Flujo másico de agente de transferencia de calor, Kg/h	4'943.585
Potencia específica de agitación, KW/m ³	240
Consumo total de potencia por agitación, KW	28.904,8

6.2 MÉTODO MODIFICADO DE DISEÑO DE BIORREACTORES CONTINUOS DE TANQUE AGITADO

En este trabajo, se propone una modificación del método convencional de diseño de biorreactores continuos de tanque agitado, en la cual, las condiciones de operación se determinan con base en el análisis de estabilidad del biosistema involucrado en el proceso.

El método modificado parte del modelamiento del sistema. Luego, por medio de diagramas de bifurcación, se analiza la estabilidad del sistema; de manera que se predicen los estados estacionarios que puede presentar el bioproceso. Con los diagramas se establecen rangos de las variables de operación donde se alcanzan estados estacionarios estables con alta conversión, alto rendimiento y/o alta productividad. Por medio de simulación dinámica se determinan las condiciones para alcanzar y mantener los estados estacionarios seleccionados. De esta manera, se definen concentraciones de arranque, y se evalúa la respuesta dinámica del proceso ante perturbaciones de los parámetros del modelo, para posteriormente formular estrategias de acción y de control. Después de conocer la estabilidad del sistema, se adoptan ecuaciones de diseño de equipos para los sistemas de transferencia de masa y de calor, y se calculan los requerimientos de potencia para agitación y el flujo de fluido de transferencia de calor con el objeto de cumplir unos requerimientos de producción previamente especificados.

6.2.1 Diseño de un Biorreactor para Producción de Etanol con el Método Modificado

Un biorreactor de tanque agitado continuo para producir diariamente 22.5 m³ de etanol con *Saccharomyces cerevisiae* se diseña usando el método modificado. Para tal fin, se parte de los resultados del análisis de estabilidad realizado para este sistema en el Capítulo 3, los cuales fueron resumidos en la **Tabla 12**.

Los flujos de alimentación de glucosa y urea se determinaron por balances de materia, tomando en cuenta el rendimiento de producto ($0,39 \text{ g}_{\text{producto}} / \text{g}_{\text{sustrato}}$) obtenido en el estado estacionario estable seleccionado. Así mismo, el flujo de agua se calculó considerando la concentración de sustrato (100 g/L) establecida para lograr dicho estado.

Los flujos de producto y de subproductos en las corrientes de salida se determinaron por medio de balances de masa. El tiempo de residencia se calculó como el inverso de la velocidad de dilución (0.2 h^{-1}) establecida previamente con el análisis de estabilidad. El volumen de operación se determinó a partir del flujo volumétrico de la corriente de entrada y de la velocidad de dilución. El consumo total de potencia y el flujo del fluido de transferencia de calor se calcularon con las mismas ecuaciones de diseño implementadas en el software *SuperPro Designer* para tal fin. En la **Tabla 18** se resumen los resultados obtenidos con el método modificado para el mismo sistema y la misma especificación de producción diaria definidos para el proceso diseñado con el método convencional.

6.3 DISEÑO POR EL MÉTODO TRADICIONAL Vs. DISEÑO POR EL MÉTODO MODIFICADO

Con el Algoritmo de Reducción de Residuos *WAR*, y los flujos másicos de cada compuesto a la entrada y a la salida del proceso, se determinaron los índice de impacto ambiental potencial generado I_{gen} y a la salida del proceso I_{out} para ambos diseños. En la **Figura 29** se presentan los resultados obtenidos con el *WAR*.

Tabla 18. Condiciones del proceso de fermentación con *Saccharomyces cerevisiae* diseñado con el método modificado.

Requerimiento de producción, m³/día	22,5
Flujo másico de etanol a la salida del biorreactor, Kg/h	843,75
Entrada	
Flujo másico de glucosa, Kg/h	2163,5
Flujo másico de urea, Kg/h	57,6
Flujo másico de agua, Kg/h	19.600
Flujo volumétrico, m ³ /h	21,62
Temperatura, °C	28
Presión, atm	1
Salidas	
Flujo másico de etanol, Kg/h	844,21
Flujo másico de levadura, Kg/h	176,94
Flujo másico de glucosa, Kg/h	287,75
Flujo másico de urea, Kg/h	13,83
Flujo másico de agua, Kg/h	19.645,03
Flujo volumétrico, m ³ /h	21,3
Temperatura, °C	30
Presión, atm	1
Flujo másico de dióxido de carbono, Kg/h	852,28
Tiempo residencia, h	5
Velocidad de dilución, h ⁻¹	0,2
Volumen de trabajo, m ³	108,1
Temperatura de operación, °C	30
Agente de transferencia de calor	Agua refrigerada
Calor transferido por enfriamiento, Kcal/h	22'282.367
Flujo másico de agente de transferencia de calor, Kg/h	4'436.761
Potencia específica de agitación, KW/m ³	240
Consumo total de potencia por agitación, KW	25.943,6

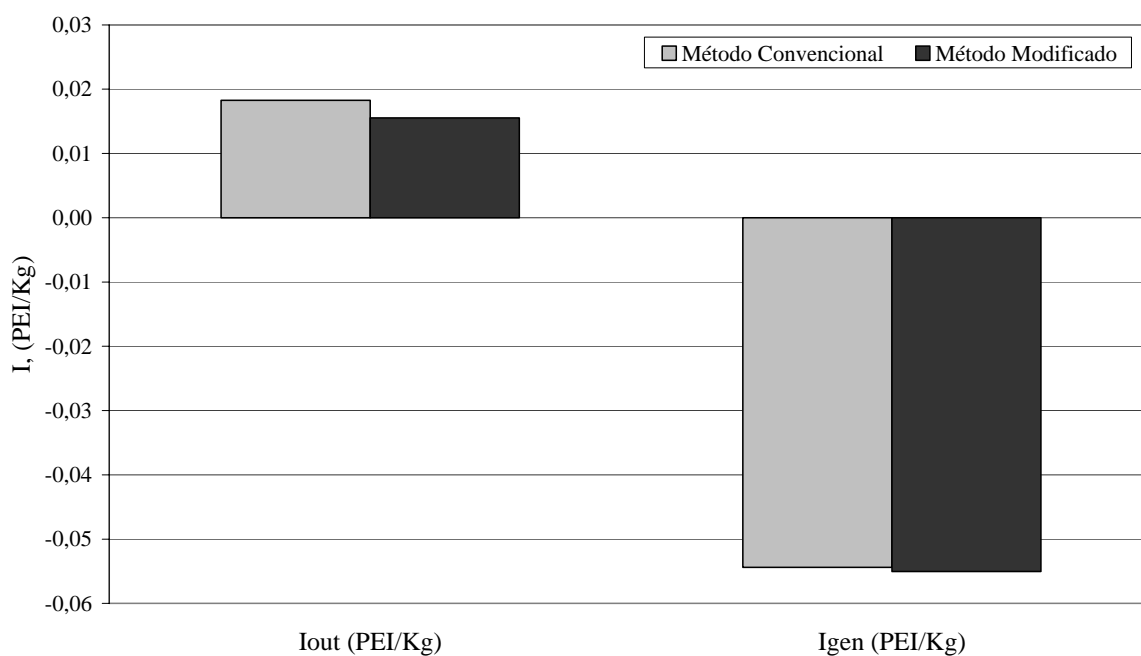


Figura 29. Índices de Impacto Ambiental Potencial para el proceso de fermentación diseñado con el método convencional y con el método modificado.

En la **Tabla 19** se hace una síntesis de los parámetros y variables de operación que caracterizan los diseños del proceso de fermentación estudiado.

Tabla 19. Parámetros y variables de operación que caracterizan los diseños del proceso de fermentación.

	Método convencional	Método modificado
Velocidad de dilución, h^{-1}	0,187	0,2
Volumen de trabajo, m^3	120,44	108,1
Concentración de sustrato en la alimentación, Kg/m^3	99,9	100,1
Conversión	0.84	0.87
Rendimiento, g/g	0,38	0,39
Productividad, $Kg/m^3 h$	7,2	7,9
Consumo de potencia, KW	28.904,8	25.943,6
Flujo másico de agente de transferencia de calor, Kg/h	4'943.585	4'436.761
I_{out} , PEI/ $Kg_{producto}$	0,0183	0,0155
I_{gen} , PEI/ $Kg_{producto}$	-0,0544	-0,0550

Según los resultados consignados en la **Tabla 19**, se puede observar que ambos diseños de la fermentación cumplen con los requerimientos de producción de etanol impuestos para el proceso. No obstante, el proceso diseñado por el método convencional reporta mayor consumo de potencia para agitación y mayor consumo de fluido de transferencia de calor. Estas variables son dependientes del volumen estimado para el reactor, el cual está ligado a la velocidad de dilución especificada para el proceso. Lo anterior indica la importancia de poder definir con un criterio claro este parámetro de operación. Pequeñas variaciones en este parámetro pueden significar altos consumos de energía.

También, se observa que los índices de generación de impacto ambiental de los procesos diseñados son similares, sin embargo, el índice de impacto ambiental para la corriente de salida del proceso diseñado por el método modificado es menor que para el proceso diseñado con el método convencional, esto se debe a que la conversión y el rendimiento logrados con las condiciones del método convencional son menores, y por lo tanto es mayor el flujo de glucosa residual y subproductos en la corriente de salida.

Por otro lado, si se observa en el Capítulo 3, el diagrama de bifurcación construido para este sistema, en función de la velocidad de dilución, para una concentración de sustrato en la alimentación de 100 g/L, se aprecia que existe un punto de bifurcación a una velocidad de dilución igual a $0,168 \text{ h}^{-1}$. Este punto está cerca de la velocidad de dilución estimada para el proceso por el método convencional (0.187 h^{-1}). Si se tiene en cuenta que en el proceso diseñado por este método se desconoce la presencia de fenómenos de estabilidad como estos, una pequeña disminución en la velocidad de dilución, cuando se opera en planta, puede provocar que el proceso caiga “inexplicablemente” en una región donde no se alcanza un estado estacionario estable, y por consiguiente sea necesario parar la fermentación.

6.4 ESTRATEGIA INTEGRAL DE DISEÑO DE BIORREACTORES

A partir del caso analizado se observa que el método tradicional de diseño de biorreactores no entrega suficiente información para desarrollar un completo diseño de un proceso de fermentación, y menos aún para implementarlo a escala industrial. Por el contrario, cuando el diseño de una fermentación se basa en un análisis de estabilidad, este provee criterios técnicos confiables para decidir acerca de la operación del biorreactor.

Con base en lo anterior, una nueva estrategia integral de diseño de biorreactores se consolida en este trabajo. La estrategia es de tipo jerárquico. Se fundamenta en el diseño del biorreactor con base en la estabilidad del biosistema involucrado. De esta manera, se provee restricciones de tipo técnico para la operación del proceso. Al método modificado, se integra la estimación de consumo de energía, y de requerimientos de fluido de servicio. También se integra el cálculo de índices de impacto ambiental potencial. Estas condiciones de producción se utilizan como puntos de comparación y de restricción para evaluar la viabilidad del proceso diseñado. Si el proceso cumple con un estándar aceptable de consumo de energía y de impacto ambiental, el diseño se implementa en planta. De lo contrario se selecciona un nuevo estado estacionario entre los definidos con anterioridad, con criterios técnicos de operabilidad, y se repite de nuevo la metodología hasta encontrar un resultado satisfactorio. La **Figura 30** presenta el esquema general de la nueva estrategia de diseño formulada.

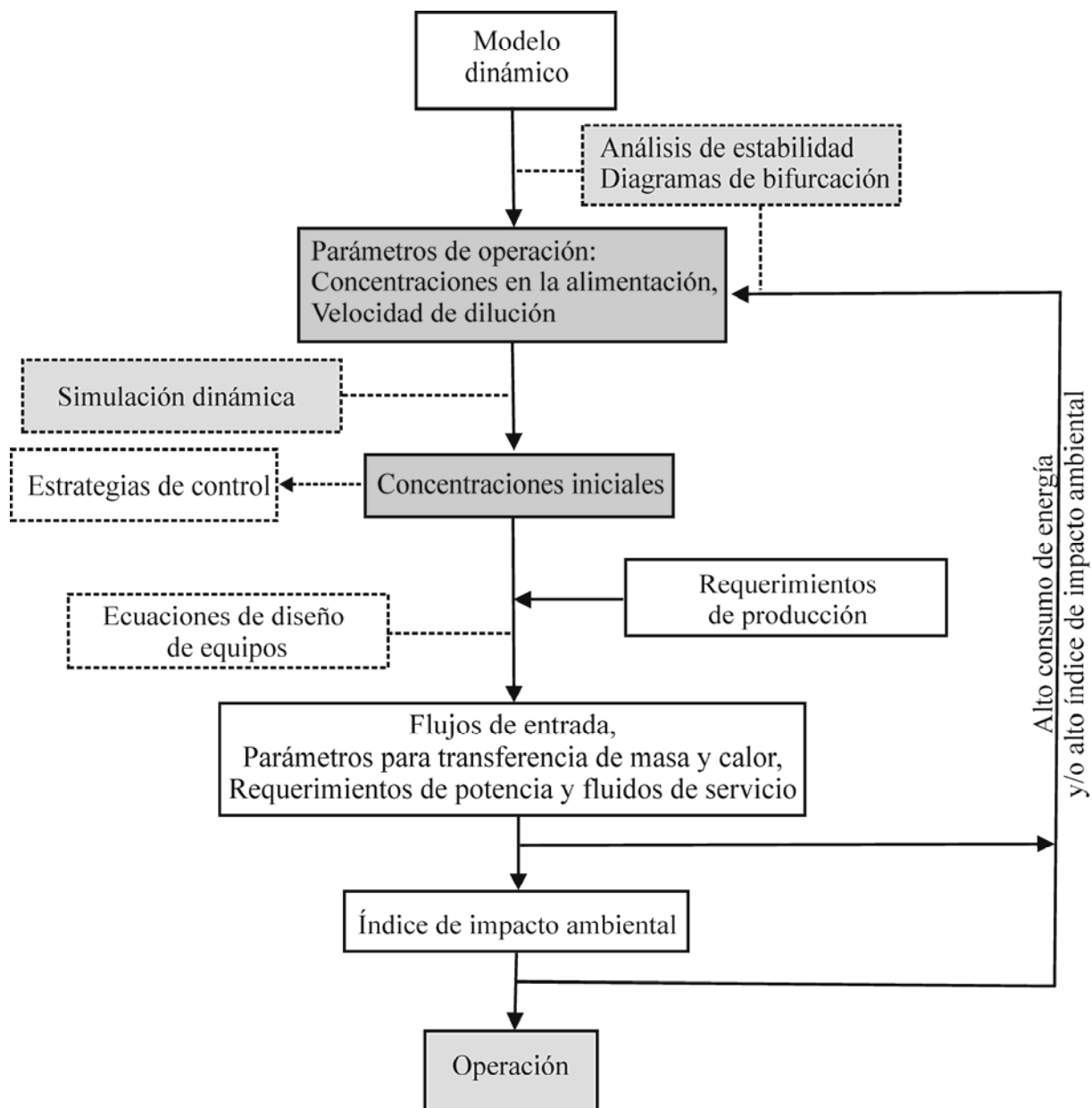


Figura 30. Esquema estrategia integral de diseño de biorreactores continuos de tanque agitado.

6.5 CONCLUSIONES

Actualmente, la operación de procesos de fermentación en continuo presenta deficiencias debido a la falta de estructura y generalización del método de diseño de los biorreactores. Por esta razón, en este trabajo se formuló una estrategia integral de diseño de biorreactores continuos en la cual las condiciones de operación se determinan con base en el análisis de estabilidad del biosistema.

Los resultados obtenidos indicaron que, con esta nueva forma de diseño, es posible definir condiciones de operación apropiadas que garantizan el alcance y mantenimiento de un estado estable de alta productividad, en equilibrio con un razonable consumo de energía, y de fluidos de servicio. Además, se da importancia a restricciones de tipo ambiental, las cuales hoy en día marcan pautas para la optimización de los procesos.

Debido a lo anterior, la nueva estrategia representa una alternativa para rediseñar bioprocesos a escala industrial, la cual evita pérdidas de tiempo y dinero durante la operación de las fermentaciones. De manera que es posible proponer proyectos realmente viables.

REFERENCIAS

1. Lenbury Y., Neamvong A., Amornsamankul S., Puttapiban P. (1999) Modelling effects of high product and substrate inhibition on oscillatory behavior in continuous bioreactors. *Biosystems* 49:191-203.
2. Ribas M., Hurtado R., Garrido N., Díaz de los Ríos M., Doménech F., Sabadí R., García T., Rodríguez D. (2006) Modelación matemática y simulación de procesos fermentativos. *Ingeniería Química*:118-125.

3. Vázquez H.J., Dacosta O. (2007) Fermentación alcohólica: Una opción para la producción de energía renovable a partir de desechos agrícolas. Ingeniería, Investigación y Tecnología 8:249-259.

CAPÍTULO 7

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

*“Buscamos a Dios con el entendimiento,
pero lo encontramos sólo con el corazón.”*

Von Göttrös

7.1 CONCLUSIONES

El análisis de estabilidad desarrollado para el proceso de producción de alcohol por fermentación con la bacteria *Zymomonas mobilis*, y la levadura *Saccharomyces cerevisiae* permitió determinar y analizar el efecto de algunos parámetros de operación sobre la respuesta del sistema. Se analizó el efecto de la velocidad de dilución y de la concentración de sustrato en la alimentación sobre la estabilidad de cada proceso de fermentación. También, se analizó el efecto de la velocidad de flujo volumétrico de gas, la velocidad de agitación, el pH y la temperatura, sobre la transferencia de masa en un sistema anaeróbico con agitación, con el fin de evaluar el comportamiento del fenómeno de desorción de CO₂ en la fermentación con *Saccharomyces cerevisiae*.

Con los diagramas de bifurcación, se tuvo un panorama del comportamiento de los estados estacionarios de cada sistema en función de la velocidad de dilución, y la concentración de sustrato en la alimentación. Se estableció que estos dos parámetros tienen una fuerte incidencia en la estabilidad del sistema. Se observó que para un estrecho rango de valores de estos parámetros, los sistemas presentan diferentes regiones de estabilidad, en las cuales se pueden presentar hasta cuatro estados estacionarios diferentes para un mismo valor de

parámetro. También se observó que es común, para ambos procesos de fermentación, el alcance de estados estacionarios estables tipo foco. El conocimiento de que se pueden alcanzar esta clase de estados es importante para la formulación de las estrategias de control del biorreactor, en especial para el arranque del proceso.

Se confirmó que pequeñas variaciones en un parámetro de operación pueden provocar que el sistema no se estabilice, o que alcance un estado estacionario de menor rendimiento al deseado, debido a las bifurcaciones que se presentan. Se definieron rangos de valores para la velocidad de dilución y la concentración de sustrato en la alimentación donde se puede alcanzar un estado estacionario estable con buen rendimiento de producto.

Mediante la simulación dinámica de los procesos, se verificó la respuesta del sistema cuando se opera a las condiciones preestablecidas con los diagramas de bifurcación. Igualmente, se determinaron condiciones iniciales para el proceso continuo que garantizan el alcance del estado estacionario de interés. De la misma forma, se obtuvo un conocimiento aproximado de la trayectoria que sigue el proceso desde el arranque hasta el alcance del estado estable.

La simulación dinámica también mostró que los procesos de fermentación continua para producir etanol son sistemas de respuesta lenta que pueden tardar entre 20 y 100 horas para estabilizarse. Incluso se observó que después de transcurridas 20 horas de operación, sin que ocurra una perturbación en los parámetros de operación, las concentraciones de las variables de interés pueden desviarse a otro estado estacionario. Esto depende de las condiciones de arranque seleccionadas. Por lo tanto, es de gran importancia determinar las condiciones de arranque para el proceso continuo que garantizan el alcance del estado estable deseado.

La simulación del proceso con el software *Aspen Custom Modeler* (ACM) permitió evaluar la respuesta dinámica del proceso cuando uno de los parámetros de operación sufre alguna perturbación durante o después del alcance del estado estacionario. Así, se determinaron las

condiciones bajo las cuales se puede mantener un estado estacionario, o en un caso dado, se puede recuperar dicho estado.

Con el análisis efectuado para evaluar el comportamiento del fenómeno de desorción de CO_2 en la fermentación con *Saccharomyces cerevisiae*, se estableció que para un rango de valores relativamente amplio de la velocidad de flujo volumétrico de gas, y de la velocidad de agitación, la concentración del dióxido de carbono en las fases líquida y gaseosa solo pueden lograr un único estado estacionario, el cual es estable. Iguaes resultados se obtuvieron para el rango establecido para la temperatura y el pH; sin embargo, no es posible generalizar las observaciones para el sistema de fermentación, ya que son parámetros que afectan directamente el crecimiento de los microorganismos y la producción de etanol. El efecto global sobre los procesos de fermentación y transferencia de masa, solo se puede evaluar en la medida que se dispone de un modelo matemático que incluya el efecto de tales parámetros en las ecuaciones cinéticas. Finalmente, se determinaron valores para la velocidad de flujo volumétrico de gas y la velocidad de agitación, con los cuales se alcanza un estado estacionario estable de baja concentración de CO_2 en la fase líquida y se garantiza un consumo moderado de potencia para agitación.

A partir de los análisis de estabilidad realizados para los sistemas de producción de etanol con *Zymomonas mobilis* y *Saccharomyces cerevisiae*, fue posible definir con un criterio técnico, condiciones de operación que garantizan, además del alcance y mantenimiento de estados estacionarios estables, un buen desempeño del proceso. Este tipo de análisis permite captar información de suma importancia para la operación de un proceso en planta, ya que revela el comportamiento del proceso, y permite trazar estrategias de operación y de acción, útiles para el control y la optimización de biorreactores a escala industrial.

Según los resultados obtenidos con el estudio experimental presentado en el Capítulo 4, se concluyó que la velocidad de agitación afecta la concentración de dióxido de carbono en la fase líquida de la forma como se había predicho en el estudio teórico. De manera que, un incremento en la velocidad de agitación, favorece la desorción del dióxido de carbono.

También se concluyó que pequeñas perturbaciones en la velocidad de agitación no tienen gran incidencia sobre el crecimiento microbiano; sin embargo, variaciones prolongadas en la velocidad de agitación pueden alterar de forma significativa el pH del medio de cultivo. Los resultados indicaron que en un sistema anaeróbico, la concentración del oxígeno disuelto en el medio no es muy sensible a la velocidad de agitación. Razón por la cual, es probable que no haya cambios en la tendencia del crecimiento microbiano. Por lo tanto, en fermentaciones anaeróbicas, el diseño del sistema de agitación debe estar determinado por la capacidad de desorber el CO_2 y de homogenizar el medio.

Los resultados del Capítulo 6, demostraron que el método tradicional de diseño de biorreactores no entrega suficiente información para desarrollar un completo diseño de un proceso de fermentación, y menos aún para implementarlo a escala industrial. Razón por la cual el desarrollo de los procesos de producción se retrasan, y el buen desempeño de los equipos y la instrumentación de control se ve seriamente afectado a largo término.

Una estrategia integral de diseño de biorreactores continuos de tanque agitado fue consolidada. En esta estrategia, las condiciones de operación se determinan con base en el análisis de estabilidad del sistema involucrado. Con ella se pueden definir condiciones de operación apropiadas que garantizan el alcance y mantenimiento de un estado estable de alta productividad, en equilibrio con un razonable consumo de energía, y de fluidos de servicio. Además, se da importancia a restricciones de tipo ambiental, las cuales hoy en día marcan pautas para la optimización de los procesos.

La estrategia, aunque fue construida a partir del análisis de sistemas de fermentación para producir etanol, se puede aplicar a cualquier bioproceso. Solo se requiere de un modelo apropiado con la capacidad de captar los fenómenos de estabilidad que presenta el sistema. Por lo tanto, la estrategia representa una buena alternativa para el diseño de biorreactores a escala industrial, ya que evita, durante la operación, caídas en la productividad del proceso. De manera que con ella se pueden proponer y diseñar proyectos realmente viables.

Con toda la investigación desarrollada se comprobó que el desarrollo de un método para el diseño de biorreactores continuos, que incluye de manera integral el análisis del comportamiento de estado estacionario y transitorio del sistema ante cambios en los parámetros de operación, permite obtener procesos biotecnológicos más eficientes y confiables en cuanto a operabilidad, calidad, consumo energético y amigabilidad con el medio ambiente.

7.2 OBSERVACIONES Y RECOMENDACIONES

La implementación del modulo *Aspen Custom Modeler* (ACM) para evaluar la respuesta dinámica de los sistemas, en tiempo real, ante cambios en los parámetros durante el transcurso de la operación abrió la posibilidad de simular biorreactores en Aspen Plus, con modelos cinéticos simples y complejos que no se encuentran disponibles en las bases de datos del simulador. De esta manera, es posible aprovechar el uso de las herramientas y beneficios que ofrece el software *Aspen Tech*, el cual está diseñado especialmente para sistemas químicos y petroquímicos, para realizar evaluaciones económicas, desarrollar análisis de sensibilidad paramétricos, y para formular estrategias de control, y de optimización en plantas de procesos biotecnológicos. Así, el modelamiento de procesos de fermentación en simuladores como el ACM permite proyectar el comportamiento de los bioprocesos a un nivel de planta, de manera que posteriormente se puede evaluar su desempeño real a escala industrial.

El algoritmo de optimización global implementado para determinar las soluciones del grupo de ecuaciones no-lineales suministra una buena metodología para evaluar todos los estados estacionarios de cualquier sistema químico o bioquímico. Esta metodología garantiza que todas las soluciones se obtienen sin depender de un estimado inicial, y se puede implementar para resolver modelos más complejos, lo cual ha sido una limitación durante el modelamiento de procesos que involucran biosistemas. Combinar y tomar ventaja de las propiedades específicas de dos *softwares* de ingeniería, tales como el GAMS

y el MATLAB, promueve su uso para el diseño de bioprocesos industriales tales como la producción de etanol.

En trabajos posteriores, el algoritmo implementado se puede ampliar con el fin de que se puedan resolver modelos que involucren discontinuidades, los cuales se traducen en problemas de programación no lineal mixta entera, que el GAMS es capaz de resolver con otro tipo de *solver*. De esta manera la metodología se podría aplicar a modelos aún más complejos.

Se propone que, para completar el análisis de estabilidad de los sistemas estudiados, se determine y se analice la aparición de estados oscilatorios dentro de la estrategia integral de diseño.

En trabajos posteriores se puede evaluar el efecto de otros parámetros, y hacer una estructura de diseño simultánea, de manera que se pueda determinar realmente el valor óptimo de los parámetros de operación. La función objetivo estaría enfocada en minimizar el consumo de energía, el consumo de fluido de servicio, y el índice de impacto ambiental para un grupo de estados estacionarios estables seleccionados.

Aunque los resultados obtenidos en este trabajo coincidieron con los resultados derivados de trabajos experimentales que se reportan en la literatura tanto para el sistema con *Zymomonas mobilis* como para el sistema con *Saccharomyces cerevisiae*, se observó que las predicciones del análisis de estabilidad están sujetas a la solución del modelo planteado. Por lo tanto, es necesario disponer de un modelo que cubra el rango de interés para los parámetros analizados, de manera que se puedan establecer condiciones generalizadas para el proceso.

Se recomienda desarrollar pruebas experimentales, donde se evalúe de forma controlada el efecto de variables mecánicas, tales como la velocidad de agitación, sobre el crecimiento de los microorganismos y la formación de producto, para definir en forma definitiva, si la

concentración de dióxido de carbono en la fase líquida tiene o no tiene un efecto adverso sobre el proceso de fermentación.

Se propone, en investigaciones futuras, determinar el efecto de la presencia de subproductos, provenientes de los procesos de pretratamiento de las materias primas, sobre la estabilidad del proceso de fermentación, tanto para materias primas ricas en sacarosa, como para materias primas amiláceas y lignocelulósicas. Lo anterior es importante, debido al creciente interés en utilizar estos dos últimos tipos de materia prima para la producción de alcohol carburante. Para el diseño de procesos a partir de estas materias primas, debe considerarse que su compleja composición, y los agresivos procesos de pretratamiento a los que se someten, conducen a la formación de una variedad de subproductos que suelen ser tóxicos para los microorganismos que fermentan.

Se recomienda analizar el efecto del pH del caldo de cultivo para diferentes sustratos complejos sobre los rendimientos de formación de biomasa y de producto. Ya que esta información es útil para plantas productoras de etanol, que intercalan el uso de jugo de caña y de melaza durante su operación. Estas materias primas, aunque tienen la misma azúcar base, tienen composición diferente, la cual, al interactuar con la acidez del medio pueden afectar los rendimientos de la producción. Razón por lo cual, es importante estandarizar condiciones de operación, por ejemplo de pH, para cuando se usan materias primas con diferentes composiciones, con el fin de no tener variaciones inesperadas en la productividad de la fermentación.

CAPÍTULO 8

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA DERIVADA DE LA TESIS

*“El hombre es mortal por sus temores
e inmortal por sus deseos.”*

Pitágoras

8.1 SOFTWARE REGISTRADO

- Paz, Isabel Cristina; Cardona, Carlos Ariel. Biodynamics. Universidad Nacional de Colombia. Manizales, julio de 2010.

8.2 TRABAJOS PUBLICADOS

8.2.1 Capítulos en Libros

- Paz, Isabel Cristina y Cardona, Carlos Ariel. Estabilidad de biorreactores para producción de etanol. En: Cardona, C. A.; Orrego, C. E. (Eds) *Avances Investigativos en la Producción de Biocombustibles*, 199-213. ISBN: 978-958-44-5261-0. Manizales, Colombia, 2009.
- Cardona, Carlos Ariel; Orrego, Carlos Eduardo; Paz, Isabel Cristina. The potential for production of bioethanol and bioplastics from potato starch in Colombia. En: Tennant,

P.; Benkeblia, N. (Eds) Potato II. Fruit, *Vegetable and Cereal Science and Biotechnology* 3 (Special Issue 1), 102-114. ISBN: 978-4-903313-26-9. U.K. 2009.

- Sánchez, Óscar Julián; Cardona, Carlos Ariel y Paz, Isabel Cristina. Fuel Ethanol from sugar cane and starch. En: Renewable Fuels: Developments in Bioethanol and Biodiesel Production. ISBN: 978-958-44-2787-8. Colombia, 2008. Carlos Ariel Cardona and Jin Suk Lee (Editores)

8.2.2 Artículos en Revistas

- Cardona, Carlos Ariel; Quintero, Julián Andrés; Paz, Isabel Cristina. 2009. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: Status and perspectives. Bioresource Technology, Vol. 101 (13): 4754-4766.
- Paz, Isabel Cristina y Cardona, Carlos Ariel. Effect of Stability of Continuous Cultures in Stirred Tank Bioreactors on Ethanol Production. Pre-aprobada en: Journal of Biotechnology.

8.2.3 Trabajos en Eventos

- Paz, Isabel Cristina y Cardona, Carlos Ariel. Fuel ethanol production: different feedstocks and steady states. En: 8th World Congress of Chemical Engineering (WCEE8). Montreal (Canadá), Agosto 23 -27, 2009.
- Paz, Isabel Cristina; Cardona, Carlos Ariel y Quintero, Julián Andrés. Análisis de la estabilidad en el diseño de biorreactores de tanque agitado continuos. En: III Congreso Colombiano de Biotecnología. Bogotá, julio 29 – agosto 1, 2008.

- Paz, Isabel Cristina; Cardona, Carlos Ariel y Gutiérrez, Luis Fernando. Estabilidad de Biorreactores Convencionales y No Convencionales. En: Memorias del III Simposio sobre Biofábricas - La Biotecnología como Herramienta para el Desarrollo y el Bienestar. Medellín, agosto 15 -17, 2007.

8.3 TRABAJOS EN REVISIÓN POR CONSEJO EDITORIAL

- Paz, Isabel Cristina y Cardona, Carlos Ariel. Influencia de las regiones de estabilidad del biorreactor en la producción eficiente de alcohol carburante. En: Revista Colombiana de Biotecnología.
- Paz, Isabel Cristina; Trejos, Víctor Manuel y Cardona, Carlos Ariel. Importancia del análisis de estabilidad en el diseño de biorreactores. En: Revista Ingeniería Química de la Asociación de Ingenieros Químicos de Uruguay.

8.4 TRABAJOS EN REMISIÓN

- Paz, Isabel Cristina; Cardona, Carlos Ariel; Matallana, Luis Gerónimo; Blanco, Aníbal y Bandoni, Alberto. Determination of all steady states for an ethanol production system using a global optimization method. En: Mathematical and Computer Modeling.
- Paz, Isabel Cristina y Cardona, Carlos Ariel. A Modified Method for Designing Bioreactors at Industrial Scale. En: Chemical Engineering Science.
- Paz, Isabel Cristina y Cardona, Carlos Ariel. Influencia de los microorganismos en la eficiencia del proceso de producción de etanol. En: Revista de la Universidad del Cauca.

8.5 TRABAJOS EN REVISIÓN POR EL TUTOR

- Paz, Isabel Cristina; Cardona, Carlos Ariel. Efecto de la temperatura de operación en estabilidad de un proceso de fermentación de melazas con reciclo de células. Para la Revista de Ingeniería de la Universidad del Valle.
- Paz, Isabel Cristina; Cardona, Carlos Ariel. Simulación de procesos de fermentación utilizando *Aspen Custom Modeler*. Para la Revista de Ingeniería de la Universidad de los Andes.
- Paz, Isabel Cristina; Cardona, Carlos Ariel. Effect of gas volumetric flowrate and agitation rate on CO₂ desorption in bioethanol production with *Saccharomyces cerevisiae*. Para la Revista Bioresource Technology.